

**Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters
der Philipps-Universität Marburg**

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt

Klinische Forschergruppe Leiter: Prof. Dr. J. Hebebrand

**Mutationsanalyse des
Pro-Opiomelanocortin-Gens bei extrem adipösen
Kindern und Jugendlichen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Klaus Nottebom

aus Siegen

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am
6.3.2003
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Johannes Hebebrand

Correferent: Prof. Dr. Koch

FRAGESTELLUNG

1. Gibt es Mutationen oder Varianten innerhalb der genomischen Sequenz des Proopiomelanocortin-Gens bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen?
2. Sind diese Mutationen oder Varianten mit Adipositas im Kindes- und Jugendalter assoziiert?

ZUSAMMENFASSUNG

Adipositas stellt in der heutigen Gesellschaft ein ernstzunehmendes gesundheitspolitisches Problem dar. Untersuchungen des „**National Center for Health Statistics**“ zwischen den Jahren 1960-94 zeigen, daß der Anteil an übergewichtigen Personen in den USA in diesem Zeitraum stetig zunahm. Neben einer erhöhten Nahrungsmittelverfügbarkeit und einer Abnahme der individuellen körperlichen Aktivität sind **genetische Faktoren** für die Entwicklung einer Adipositas verantwortlich. Adoptions- und Zwillingsstudien zeigen dies eindrucksvoll. Formalgenetische Studien belegen den genetischen Beitrag zur phänotypischen Varianz des Körpergewichts. Zudem brachten vor allem die verschiedenen Mausmodelle neue Erkenntnisse. Das Ende 1994 identifizierte Hormon **Leptin**, das von Fettzellen produziert wird, erhärtete die These einer hormonellen Rückkopplung und zentralen Steuerung der Gewichtsregulation. Auch beim Menschen konnten relevante Mutationen im Leptin-Gen bei einzelnen extrem adipösen Menschen identifiziert werden. Andere im ZNS produzierte Hormone interagieren mit diesem Regelkreis und sind somit höchstwahrscheinlich an der Gewichtsregulation mitbeteiligt. Der **Melanocortin-4-Rezeptor spielt** hierbei eine wichtige Rolle. Sowohl Tiermodelle als auch Studien am Menschen zeigen, daß spezifische Mutationen des MC4-Rezeptors mit Adipositas einhergehen. Das hier untersuchte **Proopiomelanocortin-Gen (POMC)** stellt die Matrize für den natürlichen Liganden des MC4-Rezeptors, das **α -MSH**, dar. Außer dem **α -MSH** werden die ebenfalls vor allem zentral exprimierten Hormone **ACTH, β - und γ -Lipotropin, β - und γ -MSH, β -Endorphin** und das **16-K-Fragment** vom POMC-Gen kodiert. Kopplungsanalysen dreier verschiedener Kohorten mit unterschiedlichen ethnischen Ursprüngen zeigten eine Kopplung von Plasma-Leptin-Spiegeln und dem Bereich des Chromosoms 2p, in dem das POMC-Gen liegt. Krude et al. identifizierten 1998 bei zwei Kindern mit Pigmentierungsstörungen, ACTH-Mangel und extremer Adipositas Mutationen im POMC-Gen. Bezugnehmend auf diese Ergebnisse wurde in dieser Arbeit mit Hilfe molekulargenetischer Methoden (Polymerase-Chain-Reaktion, Single-Strand-Conformation-Analysis) ein Mutationsscreen des POMC-Gens an einer Gruppe **96 extrem adipöser Kinder und Jugendlicher** durchgeführt. Es wurden acht verschiedene Varianten mittels **Single-Strand-Conformation-Analysis** gefunden und durch Sequenzierung identifiziert: Eine **9-Basenpaar-Insertion** (AGC-AGC-GGC) sowie eine **18-Basenpaar-Insertion** (AGC-AGC-GGC)₂ zwischen Position 6997/6998 der Sequenz nach Takahashi im Bereich des 16-K-Fragments, eine **6-Basenpaar-Insertion** (GGG-CCC) zwischen Position 7304/7305 der Sequenz nach Takahashi im für das γ -Lipotropin kodierenden Bereich, zwei **Punktvarianten** (Guanin→Thymin an Position 7316 und Adenin→Guanin an Position 7341 der Sequenz nach Takahashi) im für das γ -Lipotropin kodierenden Bereich, von denen eine zu einem Kettenabbruch führt (**Nonsensemutation**), und fünf Basenpaar-Austausche, bei denen sich die ursprüngliche Aminosäuresequenz nicht ändert. **Assoziationsstudien** zu diesen Varianten in einer Kontrollgruppe von 60 untergewichtigen Studenten waren negativ. Somit haben Varianten im POMC-Gen in der hier untersuchten Studiengruppe keinen generellen Einfluss auf den Phänotyp Adipositas.

INHALTSVERZEICHNIS

FRAGESTELLUNG	III
ZUSAMMENFASSUNG	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
1. EINLEITUNG	1
1.1. ADIPOSITAS	1
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Physiologische Aspekte	4
1.1.3. Entwicklung der Adipositas in der Gesellschaft	5
1.1.4. Prävention und medikamentöse Behandlung der Adipositas	7
1.2. FORMALGENETIK	10
1.2.1. Zwillingsstudien, Adoptions- und Familienstudien	10
1.2.2. Syndromale Formen der Adipositas beim Menschen	14
1.2.3. Mausmodelle	15
1.3. KANDIDATENGENE	21
1.3.1. ob-Gen	21
1.3.2. Proopiomelanocortin-Gen	25
1.4. HORMONELLE REGELKREISE	29
1.4.1. Zentrale Mechanismen der Gewichtsregulation	29
1.4.2. Periphere Regulation von Nahrungsaufnahme und Sättigung	31
2. MATERIAL UND METHODEN	34
2.1. PATIENTENREKRUTIERUNG	34
2.2. CHEMIKALIEN	35
2.2.1. Puffer und Lösungen	36
2.2.2. Enzyme	38
2.2.3. Primer	39
2.3. GERÄTE	39
2.4. DNA-EXTRAKTION	41
2.4.1. Durchführung der DNA-Extraktion	41

2.4.2.	Photometrische Konzentrationsbestimmung	42
2.4.3.	Verdünnungen und Lagerung	42
2.5.	POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	43
2.5.1.	Allgemeines Verfahren der PCR	43
2.5.2.	Etablierung der PCR für das POMC-Gen	44
2.6.	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	48
2.6.1.	Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese	48
2.6.2.	Vorbereitung und Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese	49
2.7.	DIGESTION VON DNA-FRAGMENTEN	50
2.7.1.	Allgemeines Verfahren der Digestion	50
2.7.2.	Spezielle Bedingungen der Digestion der POMC-Fragmente	50
2.8.	SINGLE-STRAND-CONFORMATION-ANALYSIS (SSCA)	52
2.8.1.	Allgemeines Verfahren der SSCA	52
2.8.2.	Vorbereitung und Durchführung der SSCA des POMC-Gens	55
2.8.3.	Färbung und Trocknen der SSCA-Gele	57
2.9.	SEQUENZIERUNG	58
2.9.1.	Allgemeines Verfahren der Sequenzierung	58
2.9.2.	Vorbereitung der Proben zur Sequenzierung	60
2.9.3.	Sequenzierung des POMC-Gens	62
2.9.4.	Der Licor-Sequencer	64
2.10.	STATISTISCHE METHODEN	66
2.10.1.	Durchführung eines statistischen Test	66
2.10.2.	Teststatistiken	68
3.	ERGEBNISSE	70
3.1.	ÜBERBLICK ALLER ERGEBNISSE	70
3.1.1.	Tabellarische und graphische Darstellung der Mutationen	71
3.1.2.	Darstellung der SSCA- Befunde	72
3.2.	EINZELDARSTELLUNG DER VARIANTEN	74
3.2.1.	Patient 1	74
3.2.2.	Patientin 2	77
3.2.3.	Patientin 3	79
3.2.4.	Patientinnen 4 und 5	81

3.2.5. Patientin 6	83
3.3. STATISTISCHE ERGEBNISSE	84
4. DISKUSSION	86
LITERATURVERZEICHNIS	97
ANHANG	109
1. LEBENSLAUF	109
2. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	110
3. DANKSAGUNGEN	111
4. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	112

TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildungen:

<i>Nummer</i>	<i>Seite</i>
ABBILDUNG 1: BMI-PERZENTILEN KURVE FÜR DAS WEIBLICHE GESCHLECHT	3
ABBILDUNG 2: OB/OB-MAUS (LINKS) UND WILD-TYP-MAUS IM DIREKTEN VERGLEICH	16
ABBILDUNG 3: TERTIÄR STRUKTUR DES LEPTIN-PROTEINS	22
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PROOPIOMELANOCORTIN-GENS (POMC) UND SEINER PRODUKTE	25
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PRINZIPS DER POLYMERASE-CHAIN-REACTION	43
ABBILDUNG 6: AGAROSE-GEL: NACHWEIS VON EINZELFRAGMENTEN NACH DIGESTION DES POMC 3A2 FRAGMENTS	51
ABBILDUNG 7: PRINZIP DER SSCA ZUR MUTATIONSSUCHE	53
ABBILDUNG 8: SSCA-GEL-AUSSCHNITT MIT WILD-TYP, HETERO-UND HOMOZYGOTER MUTATION	54
ABBILDUNG 9: SCHEMA DER SEQUENZREAKTION EINES DNA-FRAGMENTES	58
ABBILDUNG 10: SCHEMA EINER GELELEKTROPHORESE ZUR SEQUENZIERUNG	59
ABBILDUNG 11: DIAGRAM DES POMC-GENS MIT DEN EINZELNEN VARIANTEN AUS TABELLE 34	71
ABBILDUNG 11: SSCA-BANDENMUSTER VON VARIANTEN, POLYMORPHISMUS UND WILD-TYP IM PCR-FRAGMENT 3 A2 DES EXONS 3 DES POMC-GENS	72
ABBILDUNG 12: SSCA-BANDENMUSTER VON VARIANTEN, POLYMORPHISMUS UND WILD-TYP IM PCR-FRAGMENT 3 B DES EXONS 3 DES POMC-GENS	73
ABBILDUNG 13: 9 BP-INSERTION (AGC-AGC-GGC) BEI PATIENT 1 UND GENABSCHNITT EINER KONTROLL-DNA (WILD-TYP) DES GLEICHEN BEREICHS IM POMC-GEN	75
ABBILDUNG 14: 9 BP-INSERTION (AGC-AGC-GGC) BEI PATIENT 1 UND HETEROZYGOTER 9 BP-EINSCHUB BEI VATER (MITTE) UND MUTTER (RECHTS) DES PATIENTEN 1 IM GLEICHEN GEN-ABSCHNITT DES POMC-GENS	76
ABBILDUNG 15: WILD-TYP-ALLEL (LINKS) UND MUTIERTES ALLEL (RECHTS) VON PATIENTIN 2 MIT HETEROZYGOTER 18 BP-INSERTION (AGC-AGC-GGC-AGC-AGC-GGC) IM POMC-GEN	78
ABBILDUNG 16: HETEROZYGOTE 6 BASENPAAR-INSERTION UND G→T (STOP-VARIANTE) BASENAUSTAUSCH IM POMC-GEN BEI PATIENTIN 3	80
ABBILDUNG 17: HETEROZYGOTER ADENIN→GUANIN BASENAUSTAUSCH IM VÄTERLICHEN ALLEL DES POMC-GENS BEI PATIENTIN 3	80
ABBILDUNG 18: HETEROZYGOTER ADENIN→GUANIN BASENAUSTAUSCH IM POMC-GEN BEIM VATER VON PATIENTIN 3	81
ABBILDUNG 19: SEQUENZIERUNGS-AUSSCHNITT VON WILD-TYP (LINKS) UND VON PATIENTIN 5 (RECHTS) MIT HETEROZYGOTEM BASENPAAR-AUSTAUSCH (CYTOSIN→THYMIN) IM POMC-GEN	82
ABBILDUNG 20: SEQUENZIERUNGS-AUSSCHNITT VON WILD-TYP-DNA (RECHTS) UND VON PATIENTIN 4 (LINKS) MIT HOMOZYGOTEM BASENPAAR-AUSTAUSCH (CYTOSIN→THYMIN) IM POMC-GEN	83
ABBILDUNG 21: HETEROZYGOTER CYTOSIN→GUANIN BASENAUSTAUSCH IM POMC-GEN BEI PATIENTIN 6	84
ABBILDUNG 22: DARSTELLUNG MÖGLICHER SEQUENZEN, DIE DURCH SLIPPED STRAND MISPAAIRING ENTSTANDEN SEIN KÖNNEN AM BEISPIEL EINER A) 9-BASENPAAR-INSERTION B) 18-BASENPAAR-INSERTION C) 6-BASENPAAR-INSERTION IM PROOPIOMELANOCORTIN-GEN	90

Tabellen:

<i>Nummer</i>	<i>Seite</i>
TABELLE 1: GEWICHTSKLASSENEINTEILUNG MIT HILFE DES BMI NACH GARROW	2
TABELLE 2: SYNDROMALE FORMEN DER ADIPOSITAS UND JEWEILIGER VERERBUNGSMODUS BEIM MENSCHEN	14
TABELLE 3: SPEZIELLE CHEMIKALIEN UND IHRE BEZUGSQUELLEN	35
TABELLE 4: RED CELL LYSIS BUFFER (RCLB), PH 7,6	36
TABELLE 5: SE-PUFFER (PH 8)	36
TABELLE 6: TE-PUFFER (PH 8)	36
TABELLE 7: TAE-PUFFER	36
TABELLE 8: 10 X TBE-PUFFER (PH 8)	36
TABELLE 9: GEL-LADUNGSPUFFER	37
A) FÜR AGAROSE-GELE	37
B) FÜR SSCA-GELE	37
TABELLE 10: 10 X PCR-PUFFER	37
TABELLE 11: PRONASE-REAKTIONSMIX	38
TABELLE 12: MASTER-MIX	38
TABELLE 13: LÖSUNGEN ZUM FÄRBEN	38
A) DER AGAROSE-GELE	38
B) DER SSCA-GELE	38
TABELLE 14: RESTRIKTIONSENZYME	38
TABELLE 15: SONSTIGE ENZYME	39
TABELLE 16: OLIGONUKLEOTID-PRIMER ZUR AMPLIFIZIERUNG VON POMC- FRAGMENTEN	39
TABELLE 17: GERÄTE	39
TABELLE 18: CHEMIKALIEN ZUR WEITEREN PCR-OPTIMIERUNG	45
TABELLE 19: PCR-REAGENZIEN FÜR POMC-FRAGMENT 2	46
TABELLE 20: PCR- REAGENZIEN FÜR POMC-FRAGMENT 3A2	47
TABELLE 21: PCR- REAGENZIEN FÜR POMC-FRAGMENT 3B	47
TABELLE 22: THERMOZYKLER-BEDINGUNGEN	47
TABELLE 23: ANNEALINGTEMPERATUREN DER EINZELNEN PRIMER	47
TABELLE 24: DURCH PCR AMPLIFIZIERTE DNA-FRAGMENTE	48
TABELLE 25: REAKTIONSMIX FÜR DIGESTION	51
TABELLE 26: ENZYMEIGENSCHAFTEN DER DIGESTIONSENZYME	51
TABELLE 27: GELZUSAMMENSETZUNGEN ZUR OPTIMIERUNG	55
TABELLE 28: SSCA-GELZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE EINZELNEN POMC FRAGMENTE	56
TABELLE 29: REAKTIONSMIX FÜR SEQUENZREAKTION DER POMC-FRAGMENTE	63
TABELLE 30: THERMOCYCLER BEDINGUNGEN FÜR DIE SEQUENZIERUNG DER POMC FRAGMENTE	63
TABELLE 31: ZUSAMMENSETZUNG DES SEQUENZGELS	64
TABELLE 32: LI-COR EINSTELLUNGEN ZUR SEQUENZIERUNG	65
TABELLE 33: SCHEMA EINER VIERFELDERTAFEL BEIM χ^2 - TEST	68
TABELLE 34: ÜBERSICHTSTABELLE ALLER VARIANTEN IM POMC-GEN BEI EXTREM ADIPÖSEN KINDERN UND JUGENDLICHEN	71
TABELLE 35: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER STATISTISCH ERMITTELTEN ERGEBNISSE DES 9 BP POLYMORPHISMUS	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ACTH	Adreno-cortico-tropes-Hormon
Ag	Argentum (Silber)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMI	Body-Mass-Index
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines-Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CAMP	cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat
CCK	Cholecystokinin
cDNA	copy Desoxyribonucleid-Acid
Cl	Chlorid
CLIP	Corticotropin like intermediate lobe peptide
CPE	Carboxypeptidase
CRH	Corticotropes-Releasing-Hormon
CTP	Cytidin-tri-phosphat
ddNTP	Didesoxynucleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribo-Nucleid-Acid
EDTA	Ethylene diamin tetraacetic acid
G	Guanin
ICD 10	International Classification of Diseases Auflage 10
K	Kalium
LPH	Lipotropes-Hormon
LPL	Lipo-Protein-Lipase
MC4	Melano-Cortin 4
Mg	Magnesium
m-RNA	messenger-Ribo-Nucleid-Acid
MSH	Melanozyten-stimulierendes-Hormon
NCHS	National Center for Health Statistics
NHANES I	The National Health and Nutrition Examination Survey I
NHANES II	The National Health and Nutrition Examination Survey II
NHANES III	The National Health and Nutrition Examination Survey III
NHES	The National Health Examination Survey
NVS	Nationale-Verzehr-Studie
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PEG	Polyethyleneglycol
POMC	Proopiomelanocortin
PWS	Prader-Willi-Syndrom
QTL	Quantitative Trait Locus
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulphat
SSCA	Single-strand-conformation-analysis
T	Thymin
TAE	Tris-Acetyl-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UV	Ultra-Violett
V	Volt
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. Adipositas

Adipositas bezeichnet die übermäßige Vermehrung oder Bildung von Fettgewebe [Pschyrembel, 256. Auflage S.512]. In den folgenden Unterkapiteln werden die Definition, Prävention und medikamentöse Behandlung einer Adipositas näher erläutert.

1.1.1. Definition

1.1.1.1. Body Mass Index

Der **Body-Mass-Index** (BMI), auch als Quetelet-Index bezeichnet, hat sich in epidemiologischen Untersuchungen aufgrund seiner einfachen Ermittlung als ein Maß des relativen (körperhöhenbereinigten) Körpergewichts bewährt. Der BMI ist definiert als:

$$\frac{\text{Körpergewicht (kg)}}{\text{Quadrat der Körperhöhe (m}^2\text{)}}$$

Die Korrelation zum Körpergewicht ist mit 0,6-0,8 hoch, die Korrelation zur Körperhöhe mit ca. -0,15 hingegen relativ niedrig [Gray et al., 1989; Rolland-Cachera et al., 1988; Watson et al., 1979]. Der BMI korreliert stark mit der Dicke diverser Hautfalten [Micozzi et al., 1986; Must et al., 1991; Sypckerelle et al., 1988], die zur Bestimmung der Fettverteilung herangezogen werden. Der bei adipösen Frauen errechnete **Korrelationskoeffizient** zwischen BMI und der mit Magnetresonanztomographie bestimmten Fettmasse übersteigt 0,9 [Ross et al., 1993]. Der BMI kann bei Übergewichtigen und adipösen Probanden als ein einfaches und objektives Maß zur Abschätzung der Fettmasse betrachtet werden (bei Ausschluß eines Ödems oder erheblicher Muskelmassen). Bei normal- und besonders bei untergewichtigen Personen ist er jedoch in dieser Hinsicht mit Zurückhaltung zu interpretieren.

Der Body-Mass-Index wird vielfach zur Abgrenzung von Unter-/Übergewicht und Adipositas herangezogen, wobei unterschiedliche Definitionen für diese Gewichtsklassen existieren. Die **Einteilung nach Garrow** [Garrow et al., 1981] ist weit verbreitet (Tabelle 1). Hierbei erfolgt die Definition der Gewichtsklassen unabhängig

von Geschlecht und Alter. Die Prävalenzraten für Übergewicht und Adipositas sind in verschiedenen westlichen Industrienationen relativ ähnlich [Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., 1992; Gray et al., 1989]. Die in der Verbundstudie **Ernährungserhebung und Risikofaktorenanalytik** [Schneider et al., 1992] für die westlichen Bundesländer repräsentativ ermittelten Raten sind Tab. 1 zu entnehmen.

Gewichtsklassen nach Garrow	Frauen*	Männer*
<17,5 kg/m ² definiert extremes Untergewicht	1,1 %	0,2 %
< 20 kg/m ² definiert Untergewicht	12,2 %	3,8 %
20-25 kg/m² definiert Normalgewicht	46,6 %	43,3 %
25-30 kg/m ² definiert Übergewicht	28,1 %	42,0 %
> 30 kg/m ² definiert Adipositas	11,6 %	10,6 %
>40 kg/m ² definiert extreme Adipositas	0,6 %	0,1 %

Tabelle 1: Gewichtsklasseneinteilung mit Hilfe des BMI nach Garrow

*Prävalenzzahlen für Unter-, Normal- und Übergewicht sowie Adipositas in einer für die westlichen Bundesländer (inkl. West-Berlin) repräsentativen Bevölkerungsstichprobe (Alter >18 Jahren) unter Berücksichtigung der Einteilung der Gewichtsklassen nach Garrow. Um die Geschlechtsunterschiede der Prävalenzraten der beiden Gewichtsextreme aufzeigen zu können, sind zusätzlich getrennt die Raten für extreme Adipositas und extremes Untergewicht aufgeführt. Körperlänge und -gewicht wurden im Rahmen der Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktorenanalytik (VERA) gemessen; diese Stichprobe stellt eine Unterstichprobe der Nationalen Verzehrstudie dar. Modifiziert nach Hebebrand et al., 1994.

Der BMI wird klinisch überwiegend zur Diagnosenstellung von Übergewicht und Adipositas angewandt. Er wird auch zur Definition einer Anorexia nervosa herangezogen; nach **ICD-10** [World Health Organisation, 1992] ist das Gewichtskriterium, eines von mehreren Kriterien zur Diagnosestellung einer Anorexia nervosa, im Erwachsenenalter durch einen BMI unter 17,5 kg/m² erfüllt.

Die altersunabhängige Definition der verschiedenen Gewichtsklassen erweist sich als problematisch, da der BMI aufgrund ontogenetisch determinierter Schwankungen des relativen Körpergewichts im Prinzip jeweils nur unter Zugrundelegung der altersentsprechenden BMI-Verteilung adäquat interpretiert werden kann. So steigt der **BMI** in den ersten Lebensmonaten stark an und erreicht im ersten Lebensjahr einen Gipfel, um hiernach abzufallen und circa ab dem 7. Lebensjahr wieder kontinuierlich anzusteigen [Rolland-Cachera et al., 1993]. Dieser Altersverlauf ist u. a.

durch entwicklungsabhängige Schwankungen des prozentualen Anteils der Fettmasse, aber auch der fettfreien Masse am Gesamtkörpergewicht bedingt [Gray et al., 1989]. Aus diesem Grund sind in verschiedenen Ländern bereits Kurven der altersabhängigen Perzentile des BMI eingeführt worden [Hammer et al., 1991; Must et al., 1992; Rolland-Caschera et al., 1991]. Als Konsequenz dieser Überlegungen werden Adipositas und ausgeprägte Adipositas auch anhand des 85. bzw. 95. BMI-Altersperzentil definiert [Must et al., 1991].

Die 1985 vom Bundesministerium für Forschung und Technologie in Auftrag gegebene **Nationale Verzehrstudie** (NVS) erlaubte es, BMI-Perzentilekurven für die westlichen Bundesländer zu bestimmen [Anders et al., 1990]. Hierdurch kann auch in Deutschland ein definierter BMI zur altersentsprechenden Verteilung in Bezug gesetzt werden.

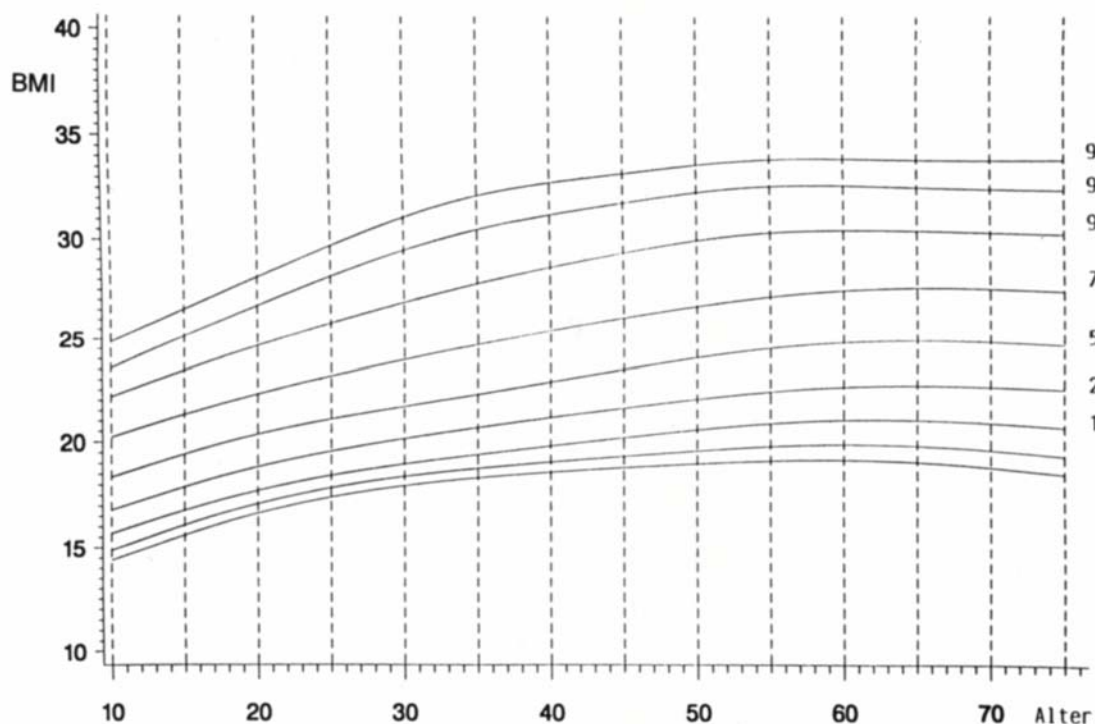


Abbildung 1: BMI-Perzentile Kurve für das weibliche Geschlecht

Die anthropometrischen Angaben zu Körperhöhe und -gewicht wurden im Rahmen der Nationalen Verzehrstudie erfragt.

(x-Achse: Lebensalter in Jahren, y-Achse links: Body-Mass-Index in kg/m^2 , y-Achse rechts: Perzentile)
Modifiziert nach Hebebrand et al., 1995.

1.1.1.2. Taille-Hüft-Verhältnis (Hip-Waist Ratio)

Eine ziemlich aussagekräftige Abgrenzung zwischen gynoider und androider Adipositas erlaubt die Bestimmung des Verhältnisses zwischen **Tailen- und Hüftumfang** (WHR, Waist-Hip-Ratio). Aussagekräftig für die intraabdominale Fettmasse ist der sagittale Durchmesser in der Höhe von Lendenwirbel 4/5 mit einem Korrelationskoeffizienten r^2 von 0,94 bei Frauen und 0,82 bei Männern [Sjostrom et al., 1986]. Die oberen Normwerte wurden aufgrund klinischer Erfahrungen bei Männern für ein Taille-Hüfte-Verhältniss von 1 und bei Frauen von 0.85 festgelegt [WHO, 1998]. Im Gegensatz zum Body-Mass-Index ist das Taille-Hüfte-Verhältniss nicht unabhängig von der Körpergröße. Trotz allem ist das Taille-Hüfte-Verhältnis als prognostisches Mittel für das Auftreten von Schlaganfällen und Herzinfarkten geeignet [Sjostrom et al., 1993]. Bei **exzessivem Übergewicht** lassen sich Unterschiede in der Fettverteilung allerdings nicht mehr zuverlässig ermitteln, und auch die prognostische Stärke des Taille-Hüften-Verhältnisses geht verloren [Krotkiewski et al., 1983].

1.1.2. Physiologische Aspekte

Da bei der Fettverteilung vermutlich verschiedene genetische Faktoren mitwirken, sollte nicht von der Adipositas schlechthin, sondern von verschiedenen Formen der Adipositas gesprochen werden [Bouchard et al., 1991]. Zukünftige genetische Untersuchungen sollen helfen die verschiedenen Formen zu differenzieren. Da dem prozentualen Anteil der Fettmasse eine erhebliche Bedeutung im Hinblick auf intra- und interindividuelle Unterschiede des Körpergewichts zukommt, sollen wichtige physiologische Aspekte zusammengefaßt werden:

Der durchschnittliche prozentuale Anteil der Fettmasse am Körpergewicht zeigt entwicklungsabhängige Schwankungen: Bei der Geburt beträgt der Anteil 12 %, bereits im sechsten Lebensmonat nimmt er einen frühen Spitzenwert von 25 % an. Hiernach sinkt der Anteil auf 15 bis 18 % in der Präpubertät ab. Mit Einsetzen der Pubertät finden sich deutliche Geschlechtsunterschiede. Bei den Mädchen kommt es zu einer erheblichen Zunahme des Fettgewebes. Im Alter von 18 Jahren macht bei Männern die Fettmasse 15 bis 18 %, bei Frauen 20 bis 25 % aus. Danach steigt sie im weiteren Leben bei beiden Geschlechtern kontinuierlich bis ins sechste Lebensjahrzehnt an. Während das Gesamtgewicht im Erwachsenenalter lediglich um 10 bis 15 % ansteigt, macht das Fettgewebe etwa 30 bis 40 % des adulten Körpergewichts aus [Gray et al., 1989].

1.1.3. Entwicklung der Adipositas in der Gesellschaft

Die ersten größeren Zahlen und damit Anhaltspunkte bezüglich der Entwicklung von Adipositas in der Gesellschaft lieferte 1959 die Veröffentlichung von Daten der **„Metropolitan Life Insurance Company“**.

Die auf den Zahlen von 100000 Versicherungsnehmern basierenden Ergebnisse zeigten, daß das Risiko eines vorzeitigen Todes stetig mit der Gewichtszunahme über das „Schwelligewicht“ von 57 kg bei 1,63 m für Frauen und 70 kg bei 1,78m für Männer korrelierte.

Das **„National Center for Health Statistics“** (NCHS) führte zwischen 1960 und 1994 vier Untersuchungen durch, die durch ein spezielles Auswahlverfahren repräsentativ für alle Altersgruppen, Einkommensstufen und ethnischen Gruppen waren:

- **„The National Health Examination Survey“** (NHES) in den Jahren 1960-62 zeigte, daß 12,8 % der amerikanischen Bevölkerung einen BMI (Body Mass Index Kap. 1.4.1) größer als 30 aufwiesen und damit adipös waren.
- **„The National Health and Nutrition Examination Survey I“** (NHANES I) zwischen 1971 und 1974 ergaben nur eine geringe Steigerung auf 14,1 %,
- ebenso **„The National Health and Nutrition Examination Survey II“** (NHANES II) im Zeitraum 1976-80 mit 14,5 %.
- Bei Abschluß des **„The National Health and Nutrition Examination Survey III“** (NHANES III) im Jahre 1994 war der Anteil an Personen mit einem BMI >30 um die Hälfte auf 22,5 % der Bevölkerung gestiegen, und 55 % der Bevölkerung waren mit einem BMI ≥ 25 zumindest übergewichtig (siehe dazu auch Kap. 1.4.1).

Die Tatsache, daß die Prävalenz der Fettleibigkeit in den letzten drei Jahren des NHANES III größer war als in den ersten drei Jahren, spricht für die Vermutung, daß sich der Trend in den kommenden Jahren fortsetzen wird [Seidell, 1995; Dep of health, 1995].

Auch Kinder sind von dieser Entwicklung nicht ausgenommen: Jungen im Alter zwischen 6 und 11 Jahren mit Übergewicht verzeichneten einen Anstieg von 15,2 % auf 22,3 % der amerikanischen Gesamtbevölkerung dieser Altersklasse im Zeitraum 1963-1991. Bei jungen Mädchen erhöhte sich der Anteil an übergewichtigen Personen zwischen 1980 und 1991 von 15,8 % auf 22,7 %. Dieser Trend gilt ebenso für die Adoleszenten in der Altersklasse 12-17 Jahre. Die Prävalenz der Adipositas hat sich in

den letzten 15 Jahren verdoppelt, und es wird eine weitere Zunahme für dieses Jahrtausend prophezeit [Seidell, 1995; Dep of health, 1995]. Diese Entwicklung bedeutet mutmasslich eine erhöhte Morbidität und Mortalität [Müller et al., 1997]. Zu den persönlichen Belastungen der betroffenen adipösen Menschen kommen auch die erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem hinzu. [Kohlmeier et al., 1993].

Als **Erklärungsversuche** für diese Entwicklung kann man verschiedene Ansätze wählen, die sich aller Wahrscheinlichkeit synergistisch ergänzen.

- 20 % des Anstiegs könnten durch den **Rückgang an Rauchern** zu erklären sein, da Männer 3,5-4 kg und Frauen 5-6 kg an Gewicht zunehmen, wenn sie das Rauchen einstellen.
- **Modernisierungen** wie Computer, Fernbedienungen und verbesserte Motorisierung in der Industriegesellschaft in Verbindung mit preiswerterer, energiereicherer Nahrung im Überfluß sorgen für einen kleineren Aktionsradius des einzelnen Individuums im Alltag, reduzieren somit den Grundumsatz und lassen eine Speicherung der aufgenommenen Kalorie in Form von Fettdepots zu.
- Im **Berufsleben** geht der Trend weg von der subsistenzuellen, körperlich anstrengenden Eigenproduktion hin zur automatisierten, möglichst ergonomischen Massenherstellung von Produkten, die häufig zum Entertainment einer inaktiven Konsumgesellschaft dienen, was wiederum zur oben erwähnten Reduzierung des täglichen Grundumsatzes und konsekutive zu einer Vergrößerung der Fettdepots führt.

Die Problematik dieser Erklärungsansätze liegt teilweise in der Schwierigkeit, der Meßbarkeit: sowohl Nahrungsaufnahme als auch physische Aktivität sind für objektivierbare Messungen nicht geeignet.

Ein völlig anderer Erklärungsansatz liegt in der Annahme **genetische Ursachen** für die Entstehung von Adipositas mitverantwortlich zu machen. Es zeigt sich an Hand von Zwillings- und Familienstudien, Tiermodellen sowie durch das Auffinden einzelner adipöser Mutationsträger, daß in diesem Bereich, unter anderem auf hormoneller Ebene, Erklärungsansätze in den nächsten Jahren konkretisiert werden könnten.

1.1.4. Prävention und medikamentöse Behandlung der Adipositas

1.1.4.1. Prävention der Adipositas

Die Erfolge einer medikamentösen Adipositastherapie sind meist gering. Langfristig können weniger als 10 Prozent der medikamentös behandelten Adipösen ein im Vergleich zum Ausgangsgewicht vermindertes Körpergewicht halten [Müller et al., 1997; Schwartz et al., 1997a]. Der Prävention des erstmaligen Auftretens einer Adipositas kommt somit eine bedeutende Rolle zu. Eine Adipositas kann sich in grundsätzlich in jedem Lebensalter entwickeln. Frühe Manifestationszeitpunkte sind die Fetalperiode, die Kindheit und die Pubertät [Dietz et al., 1996]. In diese Lebensabschnitte fallen drei wichtige **Entwicklungsphasen**:

1. Die Entwicklung hypothalamischer Regelkreise der Appetitregulation.
2. Sozialisation und Manifestation des Eßverhaltens.
3. Regulation der Adipozytenzahl und –funktion sowie der Fettverteilung.

Adipositas bei Kindern und Jugendlichen bedeutet ein hohes Risiko für **Stoffwechsel-, Herz- und Kreislauferkrankungen** sowie eine erhöhte Mortalität im Erwachsenenalter. 41 Prozent der siebenjährigen und 80 Prozent der 10-13 jährigen adipösen und übergewichtigen Kinder sind im Erwachsenenalter ebenfalls übergewichtig und adipös [Carney et al., 1976; Guo et al., 1994; Must et al., 1992; Nieto et al., 1992; Whitaker et al., 1997]. Da das Ernährungs- und Gesundheitsverhalten von Kindern von der Familie mitgeprägt wird, sollten sowohl Kinder als auch die Eltern in eine Intervention miteinbezogen werden. Der Einfluß der Eltern umfaßt neben soziokulturellen auch biologische Faktoren. Das „**Adipositasrisiko**“ der Kinder wird durch das Übergewicht mindestens eines Elternteils beeinflusst. Die genetische Prädisposition führt zu interindividuellen Varianzen des Stoffwechsels (Energieverbrauch, Fettverbrennung, Insulinsensitivität). Das bedeutet, daß eine kalorienreiche Ernährung und ein bewegungsarmer Lebensstil bei prädisponierten Menschen zu Adipositas führt, während sich der Stoffwechsel nicht-prädisponierter Menschen bei gleichen Voraussetzungen daran adaptieren kann.

Die **Kieler Adipositaspräventionsstudie** (KOPS) zeigt außerdem, daß die Prävalenz einer Adipositas bei Kindern mit Eltern, die eine schlechtere Schulbildung aufweisen, deutlich höher liegt als bei Akademikerkindern. Ebenso liegt der **BMI** bei Kindern die eine niedrigere körperliche Aktivität aufweisen signifikant höher als bei aktiven Kindern. Eine schul- und familienorientierte Intervention ist nach der **KOPS**

kurzfristig (über 4-Monate) und mittelfristig (über 1 Jahr) geeignet, den Ernährungszustand, das Ernährungswissen und tendenziell auch gesundheitsrelevantes Verhalten zu fördern.

1.1.4.2. Medikamentöse Behandlung der Adipositas

Beta 3-Adrenorezeptoren

Beta 3-Adrenorezeptor-Agonisten zeigten schon bei ihrer Entdeckung Anfang der 80er Jahre **anti-diabetische** und **anti-adipöse Effekte** in Tierversuchen mit **Mäusen**. Aufgrund entscheidender Unterschiede zwischen den beta 3-Adrenorezeptoren von Mäusen und Menschen dauerte es mehr als 15 Jahre bis man durch Klonen des menschlichen beta 3-Adrenorezeptors in der Lage war **hoch selektive und spezifische Agonisten** entwickelt zu können. Zusätzlich zu den pharmakologischen Problemen besteht die Frage ob die Anzahl an biologisch aktiven beta 3-Adrenorezeptoren im menschlichen Organismus relevante metabolische Effekte vermitteln kann, und wenn ja ob ihre **Langzeit-Stimulation** ungefährlich und nebenwirkungsarm für den jeweiligen Patienten ist.

Die Behandlung von Mäusen mit einem hochselektiven beta 3-Adrenorezeptor-Agonisten lieferte erste Beweise, daß die **chronische Stimulation** der beta 3-Adrenorezeptoren in den weißen Fettzellen zu einer vermehrten Expression von **Uncoupling Proteinen** (UCP 2 und 3) und zu einem „Wiedererwachen“ des inaktiven braunen Fettgewebes führen.

Eine achtwöchige Behandlung mit dem gleichen Agonisten zeigte beim Menschen eine Steigerung der Insulin Sensitivität, eine vermehrte **Lipolyse und Beta-Oxidation**, ohne das zusätzlich beta 1 oder beta 2 vermittelte Nebenwirkungen auftraten.

Die nächste, sich zur Zeit noch in der Entwicklung befindende, Generation dieser beta 3-Vollagonisten sollen einen besseren Einblick in die metabolische Kontrolle liefern und zeigen ob man die bis jetzt gefundenen Effekte am beta 3-Adrenorezeptor auch zur **Reduzierung des Körpergewichts** verwenden kann und sich damit neue Therapiemöglichkeiten in Bezug auf Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 bieten [Weyer et al., 1999].

Lipase inhibitoren

Orlistat ist ein relativ neuer Vertreter der **Pankreas-Lipase Inhibitoren**. Mit einer

fraktionierten Gabe von insgesamt 360 mg/Tag lässt sich eine um 30 Prozent reduzierte Fettabsorption erreichen. In Langzeituntersuchungen zeigte Orlistat im Vergleich zu Placebo eine **Gewichtsreduktion, Erniedrigung von Gesamtcholesterin und Low Density Lipoprotein**. Zusätzlich zur Gewichtsreduktion hat Orlistat einen positiven Effekt auf den Blutdruck, Glucose und Insulin Spiegel sowohl bei adipösen Patienten als auch bei Individuen mit Diabetes mellitus Typ 2 [Uusitupa et al.,1999].

Serotonin- und Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren

Sibutramin, ein Serotonin- und Noradrenalin-Reuptake-Inhibitor, ist eine pharmakologische Substanz, die ursprünglich zur **antidepressiven Therapie** entwickelt wurde, und aufgrund ihres gewichtsreduzierenden Effekts mittlerweile zur Adipositas Therapie eingesetzt wird [Bray et al., 1999].

Im **Tierversuch** wurden die Wirkungen von Sibutramin auf Futteraufnahme und Stoffwechselrate eindeutig belegt. Unter der Medikation ging die **Nahrungsaufnahme** bei Ratten dosisabhängig um bis zu **70 Prozent in 24 Stunden** zurück. Gleichzeitig erhöhte sich der Sauerstoffverbrauch durch Stimulation der **Thermogenese** um bis zu 30 Prozent. Die thermogene Wirkung wird vermutlich durch eine zentrale Aktivierung der efferenten Sympathikus-Aktivität hervorgerufen.

Bei **menschlichen Respondern** ist unter einer Tagesdosis von **10 bis 15 mg** eine optimale Gewichtsabnahme zu erwarten. In einer kontrollierten Studie lag nach 24 wöchiger Behandlung die **Gewichtsabnahme um 3 bis 5 kg** über der, die unter Plazebo erreicht wurde. Die Gewichtsreduktion schlägt sich auch in einer deutlichen Abnahme der Waist/Hip-Ratio nieder. Außerdem werden die **Triglyzerid-, Gesamtcholesterin- und LDL-Cholesterinspiegel** gesenkt, während der HDL-Cholesterinspiegel steigt. Auch Typ-II-Diabetiker und Hypertoniker profitieren von der Medikation mit Sibutramin. Die **Nebenwirkungsrate** des Sibutramin, die in Plazebo-kontrollierten Studien ermittelt wurde, ist mit **84 Prozent** nur wenig höher als unter Plazebo (71 Prozent). Die häufigsten unerwünschte Ereignisse hängen mit den pharmakologischen Wirkungen des Medikaments zusammen und umfassen **Mundtrockenheit, Appetitlosigkeit, Obstipation und Schlafstörungen**. Die klinisch wichtigsten Nebenwirkungen sind eine leichte Zunahme der mittleren Herzfrequenz und des mittleren Blutdrucks, beide Effekte stehen möglicherweise mit dem -durchaus erwünschten- thermogenetischen Effekt in Zusammenhang, der in tierexperimentellen

Studien nachgewiesen wurde [Walsh et al., 1999].

Die Antagonisierung des hungerauslösenden Hormons **Neuropeptid Y** und die Beeinflussung der **adrenocorticotropen-Hypophysen-Nebennieren-Achse** stellen weitere Interventionsmöglichkeiten dar und sind Bestandteil der heutigen Forschung [Rosenbaum et al., 1997, Bray et al., 1998].

Alle hier vorgestellten pharmakologischen Therapien haben einerseits ihre potentielle Wirksamkeit, andererseits sind ihre Einsetzbarkeit und das Ausmaß der mit ihnen zu erreichenden Gewichtsreduktion limitiert [Sheen et al., 1999]. Dies bedeutet, daß es zur Behandlung der chronischen Erkrankung „Adipositas“, einer Kombination aus **Ernährungsoptimierung, medikamentöser Behandlung** und vor allem weiterer **molekularer Grundlagenforschung** zum Verständnis der Mechanismen der Gewichtsregulation bedarf [Leonhardt et al., 1999].

1.2. Formalgenetik

1.2.1. Zwillingsstudien, Adoptions- und Familienstudien

1.2.1.1. Zwillingsstudien

Stunkard et al. analysierten 1990 den BMI einer großen Stichprobe getrennt und gemeinsam aufgewachsener **Zwillingspaare** aus Schweden. Das Durchschnittsalter der Zwillinge betrug 55,6 +/- 13,6 Jahre; das Geschlechtsverhältnis entsprach ungefähr der in der Allgemeinpopulation für die zweite Lebenshälfte charakteristischen Verteilung (40 % Männer, 60 % Frauen). Die getrennt aufgewachsenen Zwillinge waren früh getrennt worden (48 % während des ersten Lebensjahres, 82 % bis zum Alter von fünf Jahren). Die **Heritabilitätsschätzung** (Erblichkeitsschätzung) betrug für Frauen 0,66 bzw. für Männer 0,7. Die Zwillinge, die gemeinsam aufwuchsen, ähnelten sich nicht mehr als getrennt aufgewachsene. Das gemeinsame Aufwachsen hatte somit überraschenderweise keinen oder einen lediglich nicht nachweisbaren Einfluß auf den BMI, ebenso wenig der Zeitabstand zwischen Geburt und Trennung der Zwillinge.

Der **genetisch bedingte Anteil** am BMI ließ sich in additive und nichtadditive Einflüsse aufschlüsseln [Stunkard et al., 1990], wobei bei Männern nichtadditive Einflüsse deutlich, bei Frauen hingegen nur leicht überwogen. Als additive Komponente wird die Summe der durchschnittlichen Einflüsse aller das spezifische Merkmal beeinflussenden Gene bezeichnet. Die jeweiligen Gene segregieren unabhängig voneinander. Nichtadditive Einflüsse resultieren aus den

Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Allelen an einem Locus oder zwischen Allelen an verschiedenen Loci. Der genetische Einfluß auf den BMI war in allen Gewichtsklassen wiederzufinden. Umweltfaktoren, die etwa 30 % der Varianz des BMI erklären, waren für die jeweiligen Zwillinge spezifisch (sogenanntes „non-shared environment“).

Andere rezente Zwillingsstudien zeigten ähnliche **Heritabilitätsschätzungen**. Die größte Zwillingsstudie hatte zu geringfügig höheren Heritabilitätsschätzungen für den BMI geführt [Stunkard et al., 1986]. Die ausschließlich männlichen, gemeinsam aufgewachsenen Zwillinge waren erstmalig im Rahmen der Musterung zwischen 1937 und 1947 erfaßt (Alter: 20 +/- 2,6 Jahre) und 1967 nachuntersucht worden. In einer Zwillingsstudie wurde der Alterungsprozeß in die genetische Analyse miteinbezogen [Fabsitz et al., 1978]. In allen Altersstufen erklärten **genetische Faktoren** den größten Anteil der Varianz des BMI (0,82 bei Beginn bzw. 0,73 mit 63 Jahren). Unter Berücksichtigung des Alters ließ sich durch Modellberechnungen ein starker genetischer Effekt im frühen Erwachsenenalter nachweisen, der im mittleren Lebensalter um einen weiteren hiervon unabhängigen Effekt ergänzt wird: Nur etwa 40 % der genetischen Faktoren, die den BMI im Alter von 20 Jahren beeinflussten, trugen auch noch im Alter von 48 Jahren zum BMI bei. Im Altersbereich zwischen 48 und 63 Jahren wurde der BMI zu über **90 %** von den gleichen **genetischen Faktoren** beeinflusst. Gemeinsames Aufwachsen oder fortbestehender Kontakt zwischen den Zwillingen hatte keinen signifikanten Einfluß auf den BMI. Einzeln erlebte Schlüsselerlebnisse und Umwelteinflüsse des einen oder anderen Zwillings erklärten etwa 25 % der Gesamtvarianz des BMI. Diese erwiesen sich, im zeitlichen Verlauf betrachtet, als von eher kurzfristiger Natur. Möglicherweise ändern sich im Alter in Abhängigkeit vom Genotyp physiologisches Aktivitätsniveau, Umfang sportlicher Betätigung, Eßgewohnheiten, Einstellungen zur äußeren Erscheinung und Stoffwechselparameter.

Zusammengenommen sprechen diese Zwillingsbefunde für eine erhebliche Mitbeteiligung **genetischer Faktoren** am Erwachsenengewicht, wobei nichtadditive Faktoren mehr als die Hälfte des genetischen Anteils bedingen. Offensichtlich tragen altersabhängig unterschiedliche Gene zum BMI bei. Den Zwillingsstudien zufolge hat das gemeinsame Aufwachsen lediglich eine geringe Auswirkung auf den BMI; diese Beobachtung deckt sich mit einigen Adoptionsstudien [Sørensen et al., 1992], steht

andererseits im Widerspruch zu anderen Adoptions- und Familienstudien, in denen teilweise deutliche familiäre Einflüsse auf BMI sowie Energieaufnahme und -verbrauch aufgezeigt wurden [Bouchard et al., 1993].

1.2.1.2. Adoptions- und Familienstudien

Die ersten Adoptionsstudien gelangten zu teilweise widersprüchlichen Einschätzungen hinsichtlich der Bedeutung genetischer Faktoren für den BMI [Price et al., 1987]. Obwohl die neueren **Adoptions- und Familienstudien** die Beteiligung genetischer Faktoren am Körpergewicht durchgängig nahelegen, liegen die Heritabilitätsschätzungen im Vergleich zu den Zwillingsstudien trotzallem teilweise deutlich niedriger.

Hebebrand et al.[1995] bemerkten dazu, daß drei Probleme bei der Interpretation von Adoptions- und Familienstudien zu beachten seien: Erstens überwiegen nach Stunkard et al. [1990] nichtadditive gegenüber additiven Geneffekten, so daß sich der Nachweis genetischer Faktoren in Adoptions- bzw. Familienstudien von vornherein komplizierter gestalten dürfte. Zweitens müssen bei Adoptions- bzw. Familienstudien aufgrund der Altersunterschiede der Vergleichspersonen Alterskorrekturen durchgeführt werden, die aber aufgrund der intraindividuellen altersabhängig unterschiedlichen Geneffekte in bezug auf den BMI kritisch zu beurteilen sind. Drittens werden bei den verschiedenen Adoptions- und Familienstudien komplexe Berechnungen nach unterschiedlichsten Modellen vorgenommen, was wiederum Vergleiche der Studien untereinander erschwert oder sogar ausschließt.

Stunkard et al.[1986; Sørensen et al., 1989; Sørensen et al., 1992; Teasdale et al., 1990] umgingen einige der methodischen Probleme, indem sie unter Zuhilfenahme des dänischen Adoptionsregisters und des dänischen Volksregisters Fragebögen an 4642 Adoptivlinge, die zu 90 % im ersten Lebensjahr von ihren Eltern getrennt worden waren, versandten, um deren Körperhöhe und Gewicht zu erfahren. Anschließend sammelten sie die gleichen Informationen von den Adoptiveltern, den leiblichen Eltern, den leiblichen Geschwistern und den Halbgeschwistern der Adoptivlinge.

Der für jede Gewichtsklasse ermittelte durchschnittliche BMI der leiblichen Eltern stieg in Abhängigkeit vom Gewicht der Adoptivlinge [Stunkard et al., 1986]. Es zeigten sich Geschlechtsabhängigkeiten: Die Beziehung zwischen leiblichen Müttern und Adoptivkindern war hochsignifikant ($p < 0,0001$), die Beziehung zwischen

leiblichen Vätern und Adoptivkindern gerade signifikant ($p < 0,02$). Ein Test zur Trendbestimmung der Durchschnittswerte ergab eine ausgeprägte lineare Komponente für beide leiblichen Eltern. Es gelang, Körperhöhe und -gewicht 115 leiblicher Geschwister von 57 Adoptivlingen und zusätzlich von 850 Halbgeschwistern von 341 Adoptivlingen zu erhalten. Der BMI der leiblichen Geschwister stieg signifikant in Abhängigkeit von dem Gewicht der Adoptivlinge an. Der BMI der Halbgeschwister hingegen zeigte einen zwar stetigen, aber insgesamt schwächeren Anstieg über die vier Gewichtsklassen der Adoptivlinge hinweg. Da die BMI-Werte der leiblichen Geschwister der Adoptivlinge aus der höchsten Gewichtsklasse herausragten, wurde dies als Hinweis für einen besonders ausgeprägten genetischen Effekt auf die Entstehung von Adipositas aufgefaßt [Sørensen et al., 1989].

Um genetische Einflüsse von **Umwelteffekten** zu trennen, die durch die Erziehung vermittelt werden, wurde in einer weitergehenden Studie der Einfluß der sozialen Schicht der leiblichen Eltern und der Adoptiveltern auf den BMI der Adoptivlinge untersucht. Außerdem wurde der Einfluß **regionaler Faktoren** analysiert [Teasdale et al., 1990]. Die Befunde sprechen dafür, daß sowohl familiäre Umweltfaktoren als auch genetische Faktoren zu der inversen Beziehung der elterlichen sozialen Schicht zum BMI ihrer erwachsenen Nachkommen beitragen. Der genetische Anteil ist unabhängig von der **sozialen Schicht** und scheint mit zunehmendem Alter anzusteigen. Der Anteil, der durch familiäre Umweltfaktoren bedingt ist, wird durch die Korrelation der sozialen Schichtzugehörigkeit der Eltern und ihrer Nachkommen beeinflusst. Die soziale Schichtzugehörigkeit der Adoptivlinge hat selbst einen Einfluß auf den BMI, der unabhängig von der Schichtzugehörigkeit der leiblichen Väter und Adoptivväter ist.

Sowohl in einer Fortsetzung der dänischen Adoptivstudie [Sørensen et al., 1992] als auch in den Adoptionsstudien von Price et al. [1987] und Moll et al. [1991] wurden die in Stunkards Studie aufgestellten Vermutungen bestätigt und manifestiert.

Unter Zuhilfenahme von komplexen **Segregationsanalysen** fand sich ein starker Hinweis für einen **Hauptgeneffekt** (autosomal rezessiv), der fast 33 % der Varianz des korrigierten BMI erklärte. Außer diesem Hauptgeneffekt wurden 42 % der BMI-Varianz durch Polygenie erklärt. Der restliche Anteil an der BMI-Varianz (23 %) wurde Umweltfaktoren zugeschrieben. Die Mehrzahl bislang erstellter Segregationsanalysen findet Hinweise für einen Hauptgeneffekt auf den BMI.

1.2.2. Syndromale Formen der Adipositas beim Menschen

Eine ganze Reihe **genetisch bedingter Syndrome** gehen mit Adipositas einher [Bouchard et al., 1988; Bray et al., 1989; Gabrielli et al., 1992; Mc Kusick et al., 1990]. In den meisten Fällen existieren zusätzliche **phänotypische Merkmale** wie z.B. geistige Behinderung, Fehlbildungen, Wachstumsstörungen und Hypogenitalismus. Das gemeinsame Auftreten dieser Auffälligkeiten spricht für die Beteiligung des zentralen Nervensystems, insbesondere des Hypothalamus, am Entstehen von Adipositas. Für die Aufklärung der genetischen Gründe der Adipositas spielt die Erforschung der syndromalen Adipositas insofern eine Rolle, als diese Syndrome Einblicke in die Entstehungsmechanismen der Adipositas liefern können, die eventuell auch über das Syndrom hinaus ihre Gültigkeit haben könnten [Hebebrand et al., 1995].

In **Tabelle 2** sind verschiedene **syndromale Formen** der Adipositas und ihre **Vererbungsmodi** aufgelistet:

Syndrom	Genetischer Entwicklungsmechanismus
Alstrom	autosomal rezessiv
Bardet-Biedl	autosomal rezessiv
Biernacki II	autosomal rezessiv
Pickwick	autosomal rezessiv (?)
Prader Willi	paternale Deletion 15q 11 - 13 oder maternale Disomie
Achondroplasie	autosomal dominant

Tabelle 2: Syndromale Formen der Adipositas und jeweiliger Vererbungsmodus beim Menschen

Modifiziert nach Bouchard und Pérusse, 1996.

Als ein Beispiel für eine syndromale Form der Adipositas wird im folgenden das Prader-Willi-Syndrom beschrieben:

Das **Prader-(Labhart-) Willi-Syndrom** (PWS) wurde 1956 erstmals beschrieben [Prader et al., 1956]. Als Phänotyp zeigen sich eine Reihe von körperlichen (Oligophrenie, Minderwuchs, Diabetes mellitus, Akromikrie, Hypogenitalismus und Kryptorchismus) sowie psychischen Auffälligkeiten [Butler et al., 1990]. Die IQ-Spannweite der Betroffenen reicht von 20 bis 90 (60 im Durchschnitt). Das PWS kommt mit einer Häufigkeit von etwa **1:25 000** vor. Unter 1 % aller geistig Behinderten sind von diesem Syndrom betroffen.

Von entscheidender diagnostischer Bedeutung ist die schwere **stammbetonte Adipositas**, die typischerweise im frühen Kindesalter einsetzt, nachdem im Säuglingsalter meist erhebliche Ernährungsschwierigkeiten (z.B. in Form von Trinkschwäche) und Untergewicht bestanden haben. Die später folgende Adipositas kann unbehandelt zum Tode führen. Auslöser für diese Adipositas ist eine **Hyperphagie**, die durch einen verminderten Grundumsatz noch verstärkt wird. Als einzig wirksame Therapie gilt neben einzelnen Pharmaka, die die Hyperphagie herabregulieren, das Isolieren der Betroffenen von dem Zugriff auf Nahrungsmittel [Butler et al., 1990].

Das PW-Syndrom stellt ein Beispiel für „**Imprinting**“ dar, da das Vorhandensein mindestens eines funktionsfähigen väterlichen Allels in der Region 15q 11-13 für die normale Entwicklung des Menschen notwendig ist [Hebebrand et al., 1995].

Am Beispiel des PW-Syndroms wird die Komplexität der genetischen Mechanismen deutlich; die Aufklärung solcher syndromalen Formen der Adipositas bedeutet einen erheblichen Fortschritt für das Verständnis molekulargenetischer Abläufe und möglicher Interventionen.

1.2.3. Mausmodelle

Gewicht und Fettverteilung verschiedener Haustiere lassen sich durch kontrolliertes Züchten in teilweise erheblichem Umfang beeinflussen [Burniat et al., 1992].

Zusätzlich ist es in **Tierversuchen** möglich, bestimmte Gene von Tieren mittels 'gene targeting' auszuschalten und somit sogenannte „**Knock-out**“-Tiere heranzuzüchten. Diese Methoden ermöglichen die Durchführung ganz gezielter Versuche an bestimmten Regionen, denen eine Mitbeteiligung zum Beispiel an der Gewichtsregulation nachgesagt wird.

Hierfür werden in der modernen Gewichtsforschung vorzugsweise Ratten und Mäuse als Tiermodelle ausgewählt. Aufgrund der bekannten **Homologie** zwischen Mäusegenom und menschlichem Genom kann bei im Mäusegenom lokalisierten Genen auf die mutmaßliche Lokalisation des Gens im menschlichen Organismus geschlossen werden. Diese Regionen können dann im weiteren mit Hilfe verschiedener molekulargenetischer Methoden untersucht werden [Hebebrand et al., 1995].

In den letzten Jahren und Jahrzehnten sind verschiedene Mausmodelle spontan entstanden oder entwickelt worden, die zu einem verbesserten Verständnis der Gewichtsregulation auf genetischer Ebene beigetragen haben.

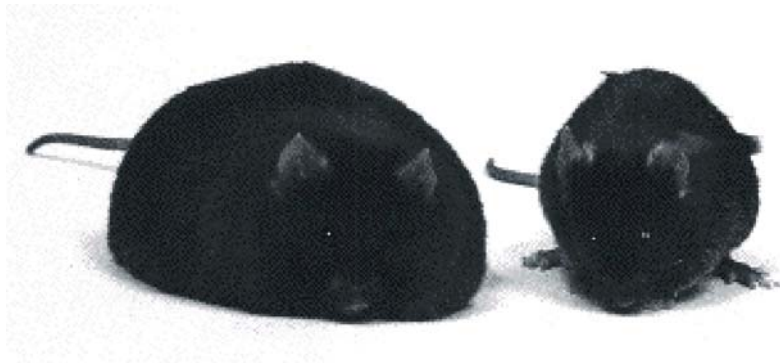


Abbildung 2: Ob/ob-Maus (links) und Wildtyp-Maus im direkten Vergleich

Modifiziert aus dem Internet: <http://aci.mta.ca/Courses/Biochemistry/BC4511B-Lipid/Kevin/1Leptin#Intro>

1.2.3.1 Die Obese-Maus

Seit 1950 ist der Phänotyp der autosomal rezessiven **Obese (ob)-Maus** bekannt. Es zeigt sich eine früh einsetzende Form der Adipositas (Vervielfältigung des Körpergewichts gegenüber Wildtypmäusen (Siehe Abbildung 2)) und als weitere Kernsymptome Hyperphagie, Diabetes, Hyperthermie und Infertilität der Weibchen. Das Ausmaß des Übergewichts wird ebenso wie der Schweregrad des Diabetes durch den genetischen Hintergrund mitbeeinflusst [Hinney et al., 1997].

1994 konnte die Arbeitsgruppe um Friedman das Obese-Gen erstmals klonieren. Identische Sequenzen (Homologien) mit anderen Genen konnten nicht nachgewiesen werden [Zhang Y et al., 1994]. Bei der Strukturanalysen des aus **167 Aminosäuren** bestehenden Proteins zeigte sich ein helikaler Aufbau, der schon von verschiedenen Zytokinen bekannt ist [Madej et al., 1995]. Bei Zytokinen weiß man schon seit längerem, daß mehrere von ihnen an der Regulation der Nahrungsaufnahme bzw. des Energieverbrauchs beteiligt sind (z.B. bei Infektionen bzw. Tumorerkrankungen). Das Obese-Protein wird vornehmlich in **Fettzellen** synthetisiert und von diesen in die Blutbahn sezerniert [Hinney et al., 1997]. Die Plasmaspiegel des als Leptin bezeichneten Genprodukts korrelieren beim Menschen mit dem **Body-Mass-Index** und noch stärker mit dem prozentualen Anteil der Fettmasse am Gesamtkörpergewicht [Considine et al., 1996]. Die Sekretion findet in einem circadianen Rhythmus statt; in der Nacht liegen die

Spiegel um ca. 50 % über den Tageswerten [Sinha et al., 1996]. Von einzelnen Mahlzeiten hingegen ist der Leptinspiegel unabhängig [Considine et al., 1996; Sinha et al., 1996].

Die Applikation des **rekombinanten Proteins** läßt sämtliche Symptome der ob/ob- Maus, einschließlich der Infertilität, verschwinden [Pellymeunter et al., 1995; Halaas et al., 1995; Campfield et al., 1995; Chehab et al., 1996]. Die Reduzierung des Körpergewichts wird sowohl durch eine Einschränkung der Energieaufnahme als auch eine Erhöhung des Energieverbrauches, verursacht durch eine Temperaturerhöhung und eine vermehrte Spontanaktivität, erreicht. Das Leptin steuert die Energieaufnahme und den Energieverbrauch vermutlich durch die Regulation anderer Hormone und Neurotransmitter wie z.B. dem Neuropeptid Y [Stephens et al., 1995]. Bei Menschen und Nagern konnte nachgewiesen werden, daß sich die Leptinsynthese durch **Insulin** [MacDougald et al., 1995], Glukokortikoide [DeVos et al., 1995; Murakami et al., 1995] und **fettreiche Diät** erhöht [Trayhum et al., 1995a; Saladin et al., 1995]. Zu einem Abfall der Plasma-Leptin-Spiegel führen hingegen **Noradrenalin** und Kälteexposition [Trayhum et al., 1995b]. Gemeinsam deuten diese Befunde auf eine wichtige Rolle von Leptin bei der Regulation des Körpergewichts hin und bestätigen die lange bestehende „**Lipostat**“-**Hypothese**. Diese besagt, daß die Fettmasse dem Organismus, insbesondere dem Gehirn, Informationen zukommen läßt, sodaß das Körpergewicht konstant reguliert werden kann. [Hinney et al., 1997]. Rezeptoren für das Hormon Leptin wurden außer im **Hypothalamus** und **Plexus choroideus**, auch in Lunge, Niere, Ovar und Knochenmark lokalisiert [Tartaglia et al., 1995; Lee et al., 1996].

Zwei bekannte Mutationen im Obese-Gen rufen den beschriebenen Phänotyp hervor. Die Folge beider Mutationen ist die fehlende Bildung funktionsfähigen Leptins [Zhang et al., 1994].

Unter phylogenetischen Gesichtspunkten ist eine Rolle des Leptins in **Hungerepisoden** möglich, um dort Mensch und Tier ein Überleben zu ermöglichen. Während einer Starvation kommt es dabei zu einer Reihe von **metabolischen Veränderungen** (z.B. hypothalamisch-hypophysären Hypogonadismus, erniedrigte Schilddrüsenhormonsynthese etc.), die als Anpassungsreaktion verstanden werden können [Hinney et al., 1997]. Diese starvationsbedingten metabolischen Veränderungen treten nicht ein, wenn hungernden Mäusen exogen Leptin appliziert wird. Da die Konzentrationsunterschiede zwischen dünnen und adipösen Individuen im Liquor nicht so

ausgeprägt wie im Serum existieren, scheint Leptin über ein **saturables Transportsystem** die Blut-Hirnschranke zu überwinden [Caro et al., 1996].

1.2.3.2 Die Diabetes-Maus

Die **db/db-Maus** entspricht vom Phänotyp der oben beschriebenen ob/ob-Maus. [Hinney et al., 1997]. 1972 postulierten Coleman et al. anhand ihrer Experimente, daß der ob/ob-Maus ein im Blut **zirkulierender Sättigungsfaktor** fehlt, die db/db-Maus hingegen den entsprechenden Rezeptor nicht ausbilden kann [Coleman et al., 1972]. Dieser **Leptinrezeptor** (OB-R oder db) wurde Ende 1995 identifiziert und charakterisiert [Tartaglia et al., 1995]. Den Phänotypen der db/db-Maus und der Fa/Fa (Fatty)-Ratte liegen unterschiedliche Mutationen des Rezeptor-Gens zugrunde [Chen et al., 1996; Chua et al., 1996; Lee et al., 1996].

Die größte Ähnlichkeit des Rezeptors besteht zu gp 130, einem signalübertragenden **Protein der Klasse-I-Zytokinrezeptoren** (z.B. Interleukin-6-Rezeptor) [Tartaglia et al., 1995]. Zusätzlich zur Produktion des db-Rezeptors zentral im Plexus Choroideus und in Testis und Fettgewebe [Lee et al., 1996] wurden die größten mRNA-Mengen in Lunge und Niere gefunden [Tartaglia et al., 1995]. Daher vermutet man für diese Organe eine **Clearance-Funktion** im Bezug auf Leptin und sieht darin die Erklärung für erhöhte Leptinspiegel bei Erkrankungen dieser Organe. Das Gen für den db-Rezeptor ist auf **Chromosom 1p31** lokalisiert worden [Chung et al., 1996].

1.2.3.3. Die Agouti-Maus

1962 beschrieb Dickie die erste spontan entstandene dominante Mutation (viable yellow, A^{vy}/a) am **Agouti-Genort**. Anstelle der ursprünglichen schwarzen Fellfarbe wiesen die mutierten Mäuse ein gelbes Fell auf. In der Folgezeit wurden weitere dominante und rezessive Mutationen am Agouti-Genort, der sich auf **Chromosom 2** der Maus befindet, beschrieben.[Übersicht: Siracusa, 1994].

Zusätzlich zur gelben Fellfarbe verursachen die dominanten Mutationen noch verschiedene biologische Prozesse, so daß pleiotrope Effekte, u.a. Typ-II-Diabetes, Adipositas und eine erhöhte Prädisposition zur Entstehung von Tumoren entstehen. Die Adipositas der Agouti-Maus setzt allerdings erst in der Reife ein, im Gegensatz zur

„early onset obesity“ der ob/ob- und db/db-Mäuse. Zusätzlich sind Hyperphagie, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie, erhöhte Lipogenese der Leber und erniedrigte Lipolyse der Adipozyten weitere phänotypische Merkmale des Obesity-Syndroms der Agouti-Maus [Huszar et al., 1997].

Das Agouti-Genprodukt wirkt als **parakriner Signalfaktor** und wird bei der Maus nur in Melanozyten, Testis und während der Embryonalentwicklung produziert. Durch diesen Signalfaktor findet durch Verminderung des intrazellulären cAMP-Spiegels in den Melanozyten die Umschaltung der Synthese von Eumelanin (schwarzes Pigment) zu Phaeomelanin (gelbes Pigment) statt [Bultmann et al., 1992]. Das Agouti-Genprodukt antagonisiert das **Melanozyten-stimulierenden Hormon** (α -MSH), das an den Melanocortin Rezeptoren (MC1+MC4) bindet [Lu et al., 1994]. Diese Rezeptoren der Melanocortin-Familie befinden sich auch im Gehirn und sind an neuroendokrinen Funktionen und dem sympathischen System beteiligt.

Der Phänotyp der **gelben Fellfarbe** erklärt sich auf genotypischer Ebene durch dominante Mutationen [Duhl et al., 1994]. Die dominanten Mutationen in den regulatorischen Elementen des Agouti-Gens bewirken einerseits eine Überexpression in den Melanozyten und damit eine vollständige Umkehr der Synthese hin zum **Phaeomelanin**, was zu einer gelben Fellfarbe führt, andererseits auch eine ektopische Expression des Signalfaktors in allen Organsystemen, die die anderen phänotypischen Merkmale, u.a. die Adipositas, erklären.

Weil nachgewiesenermaßen eine antagonistische Wirkung des Agouti-Proteins am **Melanocortin-4-Rezeptor** (MC4-R) im zentralen Nervensystem existiert [Lu et al., 1994] ist man sicher, daß das ektopisch exprimierte Agouti-Protein über den MC4-Rezeptor, auf die **Gewichtsregulation**, die Sättigung oder Insulinproduktion einwirkt, da der MC4-Rezeptor fast ausschließlich in den Kernen (ventromediale, laterale, dorsomediale und paraventriculäre Nuclei des Hypothalamus) vorkommt, die für die Gewichtssteuerung zuständig sind.

1.2.3.4. Die fat-Maus

Coleman und Eicher veröffentlichten 1990 die relevanten Befunde über zwei als Spontanmutationen entstandene autosomal rezessiv vererbte Syndrome, die mit dem Leitsymptom Übergewicht einhergehen. Mutationen in den Genen *fat* und *tubby* bewirken bei Mäusen eine sich langsam entwickelnde (ab der 12.-18. Lebenswoche)

und in einer ausgeprägten Form endende Adipositas.

Charakteristisch für Tiere mit der fat-Mutation sind eine **chronische Hyperinsulinämie** nach dem Ende der Stillzeit und eine **postpubertäre Fettsucht** ohne Hyperglykämie.

1.2.3.5 Die tubby-Maus

Der Phänotyp der **tubby-Maus** äußert sich in Übergewicht, das durch einen reduzierten Energieverbrauch bei fehlender Hyperphagie entsteht und bei homozygoten (reinerbigen) Mäusen erst nach drei bis sechs Monaten erkennbar ist.

Außerdem werden bei tub/tub-Mäusen **sensorische Defekte** (retinale Degenerierung und neurosensorischer Taubheit) beobachtet, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit an die humanen **Alström- und Bardet-Biedl-Syndrome**, die beide autosomal rezessiv vererbt werden, erinnern [Noben-Trauth et al., 1996; Kleyn et al., 1996].

Das Kandidatengen hat große Ähnlichkeit (20-40 % identische Aminosäuren) zu einer **Phosphodiesterase**, die dafür bekannt ist, retinale Degeneration durch Zelltod (Apoptosis) von Photorezeptorzellen zu verursachen. Der Zusammenhang zur spät einsetzenden Adipositas könnte mit einem apoptotischen Prozeß zusammenhängen, der auch für die retinale Degeneration verantwortlich ist. Hauptexpressionsorte des tub-Gens sind Cortex, Hippocampus und Hypothalamus (Nucleus arcuatus).

1.3. Kandidatengene

Als Kandidatengene bezeichnet man Gene, die aufgrund ihrer biologischen Funktion oder ihrer chromosomalen Lokalisation möglicherweise zur Ätiologie einer bestimmten Krankheit beitragen [Böddeker et al., 2000]. In diesem Kapitel werden das ob-Gen und das POMC-Gen als Kandidatengene für das Krankheitsbild Adipositas näher vorgestellt.

1.3.1. ob-Gen

Das ob-Gen der Maus befindet sich auf Chromosom 6 des Mäusegenoms und ist an das MET-Onkogen gekoppelt. Dieses MET-Onkogen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 7. Aufgrund verschiedener Marker, die das ob-Gen flankieren, und Homologe zu den Markern des Maus-ob-Gens darstellen, vermuteten Friedmann et al. 1991 die **Position 7q31** für das menschliche ob-Gen. 1995 wurde die exakte Position 7q32 mittels „fluoreszenz-in-situ-hybridisierung“ bestimmt [Geffroy et al., 1995]. Das menschliche ob-Gen besteht aus **3 Exons** und **2 Introns** und überspannt einen Bereich von 18 Kilobasen [Gong et al., 1996].

Das ob-Gen wird fast ausschließlich in Adipozyten exprimiert und dient als Matrize für das **167 Aminosäuren** umfassende **Leptin** (Siehe Abbildung 3). Die Aminosäuresequenz des menschlichen Leptins entspricht zu 84 % der der Maus. Leptin zirkuliert gebunden und ungebunden als ein Monomer im Plasma sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen und enthält eine funktionelle Signalsequenz, die mutmaßlich für die Sekretion des Proteins verantwortlich ist [Zhang et al., 1994].



Abbildung 3: Tertiärstruktur des Leptin-Proteins

Modifiziert aus dem Internet: <http://aci.mta.ca/Courses/Biochemistry/BC4511B-Lipid/Kevin/1Leptin#Intro>

Es wird posttranslationell nicht mehr modifiziert [Cohen et al., 1996a], und die Analyse der Kristallstruktur weist es als Mitglied der Zytokin-Familie mit vier bis fünf helikalen Segmenten aus [Madej et al., 1995; Zhang et al., 1997].

Den **Wirkungsort** für Leptin bildet der **Leptin-Rezeptor**, dessen Gen (OB-R) 1995 von Tartaglia et al. erstmalig aus Mäuse-Choroid isoliert und kloniert wurde. Es handelt sich um ein Mitglied der **Zytokin-Rezeptor-Familie**, und es existieren mindestens fünf verschiedene Splicevarianten des Rezeptors, für die das OB-R-Gen kodiert. Eine der Spliceformen, OB-Rb, wird im hohen Maße im Hypothalamus und nur vereinzelt in anderen Geweben exprimiert [Ghilardi et al., 1996; Lee et al., 1996]. Diese Isoform des Rezeptors besitzt im Gegensatz zu den anderen vier Formen eine lange zytoplasmatische Region mit verschiedenen für die Signaltransduktion wichtigen Proteinelementen [Tartaglia et al., 1995; Lee et al., 1996; White et al., 1997].

Im menschlichen Organismus besteht eine signifikant hohe Korrelation zwischen Körperfettmasse und dem **Plasma-Leptin-Spiegel**. Im allgemeinen haben übergewichtige Individuen einen hohen Leptin-Plasma-Spiegel [Maffei et al., 1995b; Considine et al., 1996b].

Die Vermutung, daß die Höhe des Leptin-Plasma-Spiegels für das gewichtsregulatorische Zentrum das **Feedback-Signal** über die Körperfettmasse darstellt und damit den afferenten Schenkel im Regelkreis **Körperfett→Hypothalamus→Nahrungsaufnahme** bzw. Energieverbrauch bildet, wurde durch die Erkenntnisse, die man aus den verschiedenen Mausmodellen gewann, erhärtet. Allerdings konnte die Mutation, die im Mäuse-ob-Gen zu einem Stop-Codon führt, im menschlichen ob-Gen nicht nachgewiesen werden. Im menschlichen ob-Gen wären zwei Nukleotid-Substitutionen notwendig, um das an Codon 105 produzierte Arginin in ein Stop-Codon zu verwandeln [Considine et al., 1995].

Nachdem zunächst verschiedene signifikante Korrelationen zwischen Plasma-Leptin-Spiegel und Body-Mass-Index [Weigle et al., 1997, Lonnquist et al., 1995] für eine Rolle des Leptins bei der Gewichtsregulation sprachen, viele Mutationssuchen allerdings negativ ausfielen, wurden 1997 die ersten **Mutationen** im menschlichen ob- und db-Gen gefunden:

1. Die Arbeitsgruppe um Montague beschrieb zwei blutsverwandte **stark adipöse Kinder** mit extrem niedrigen Plasma-Leptin-Spiegeln, die beide homozygot für die **Deletion** einer **Guanin-Base in Codon 133** des ob-Gens sind, was schließlich zu einer Leserasterverschiebung und einem Stop-Codon führte. Beide Kinder hatten ein normales Geburtsgewicht, entwickelten aber ab dem 3. Lebensmonat eine Hyperphagie und Adipositas. Das Mädchen wog im Alter von acht Jahren 86 Kilogramm bei 57 % Fettmasse, ihr Cousin im Alter von zwei Jahren 29 Kilogramm bei 54 % Fettmasse. Die für die Mutation heterozygoten Eltern und Geschwister zeigten keine Anzeichen einer extremen Adipositas [Montague et al., 1997].
2. Strobel et al. fanden 1998 bei einem türkischen Patienten sehr niedrige Plasma-Leptin-Spiegel in Kombination mit einem Body-Mass-Index von $55,8 \text{ kg/m}^2$. Die molekulargenetische Untersuchung zeigte einen **C→T Basenaustausch**, der zu einem Aminosäureaustausch Arginin-105-Tryptophan des Leptins führte. Es wurden zwei weitere homozygote Mutationsträger entdeckt, die beide relativ zu ihrem erhöhten BMI erniedrigte Plasma-Leptin-Spiegel und eine extreme Adipositas aufwiesen. Da zwei der drei Mutationsträger Erwachsene waren, konnten erstmals

Rückschlüsse auf die **Reproduktionsfähigkeit** im Zusammenhang mit ob-Gen-Mutationen beim Menschen gezogen werden. Die weibliche erwachsene Mutationsträgerin zeigte eine primäre **Amenorrhoe**, der männliche erwachsene Mutationsträger trat nie in die Pubertät ein, sondern zeigte die klinischen Merkmale eines **Hypogonadismus**: keinen Bart, spärliche Pubes- und Axillarbehaarung, Gynäkomastie, kleiner Penis und Hoden [Strobel et al., 1998].

3. 1998 wurden von Clement et al. über erhöhte Leptin-Plasma-Spiegel auch menschliche Mutationsträger für das Leptin-Rezeptor Gen identifiziert. Ein homozygoter **Guanin→Adenin- Basenaustausch** in Exon 16 des **Leptin-Rezeptor-Gens** (ob-R) führte bei drei Schwestern im Alter von 13 und 19 Jahren zu einem verkürzten Leptin-Rezeptor, dem die transmembrane und intrazelluläre Domäne fehlt. Die drei Probandinnen hatten ein normales Geburtsgewicht, entwickelten aber schon in den ersten Lebensmonaten eine Hyperphagie und weisen mittlerweile Body-Mass-Indizes zwischen 52,5 und 71,5 kg/m² auf. Zusätzlich zur früh einsetzenden Adipositas fehlt bei den Probandinnen das Einsetzen der Pubertät, die Sekretion der Wachstumshormone und des Thyreotropins ist vermindert. Weitere Geschwister und die Eltern der Probandinnen zeigen als heterozygote Träger der Mutation eine normale Gewichts- und Pubertätsentwicklung. Dies läßt vermuten, daß nur das Fehlen beider funktionstüchtiger Allele die Gewichtsregulation phänotypisch beeinflußt.

Die gefundenen Mutationen sprechen für eine Beteiligung des Leptins an der **Gewichtsregulation**. Die 2. Mutation des Leptin-Gens und die Mutation im Leptin-Rezeptor-Gen lassen zusätzlich eine Notwendigkeit des Vorhandenseins von Leptin zur Initiierung der menschlichen **Pubertät** vermuten.

1.3.2. Proopiomelanocortin-Gen

Arbeiten an den Strukturen des **Corticotropins** (ACTH) zeigten, daß sechs verschiedene Hormone auf der Basis eines Gens produziert werden.

Die Hormone ACTH, γ -Lipotropin, α -MSH, β -MSH, β -Endorphin und Corticotropin like intermediate lobe peptide (CLIP) werden aus dem nach Chretien et al. bezeichneten Vorläufer-Peptid Proopiomelanocortin (POMC) gebildet [Chretien et al., 1979]. In **Abbildung 4** sind die verschiedenen Hormone und die für sie kodierenden Bereiche im Gen dargestellt.

Die **Primärstruktur** des POMC-Gens wurde 1980 durch Chang et al. mittels Clonierung ermittelt. Das POMC-Gen beinhaltet **drei Exons**: **Exon 1** mit **86 Bp** und **Exon 2** mit **152 Bp** kodieren nicht für ein Genprodukt, **Exon 3 (833 Bp)** mit den variabel kodierenden Bereichen für ACTH, γ -Lipotropin, α -MSH, β -MSH, β -Endorphin und **Corticotropin like intermediate lobe peptide (CLIP)** wird nicht durch Introns unterbrochen. Das Gen enthält außerdem zwei große **Introns**: Eines mit 3708 kB unterbricht das N-terminale Fragment des Vorläuferpeptids, das andere mit 2886 kB beinhaltet die Sequenz für einen Teil des 5' untranslatierten Bereichs der m-RNA, alle Signalpeptide und acht Aminosäuren des N-terminalen Fragments [Baxter et al., 1981].

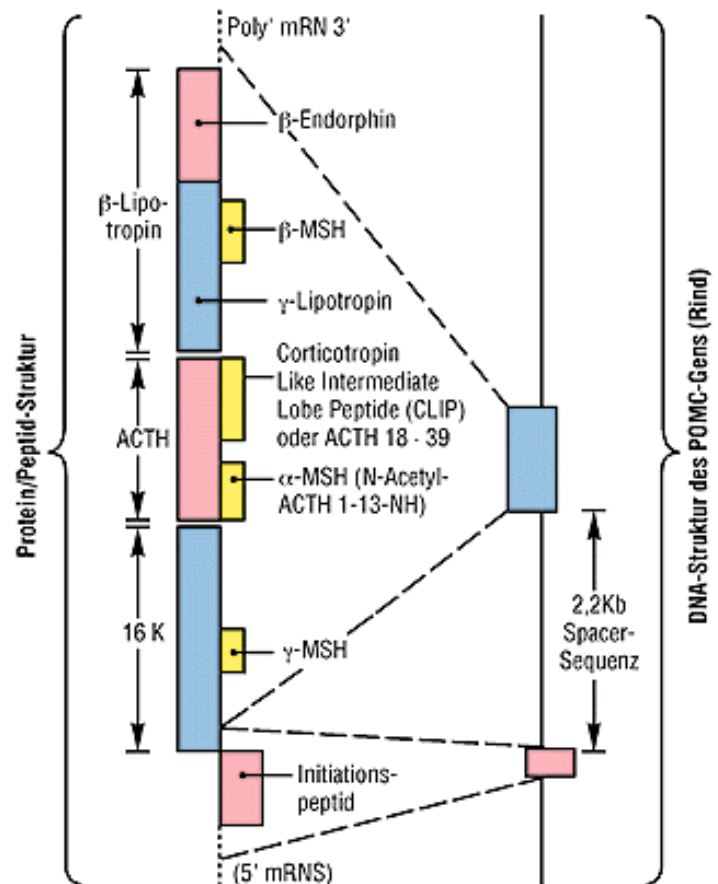


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Proopiomelanocortin-Gens (POMC) und seiner Produkte

Modifiziert nach Roche-Lexikon 3.5

Das gesamte glykosilierte Prohormon mit einem Molekulargewicht von 31 KD [Eipper and Mains et al., 1980] wird in Schilddrüse, Plazenta und Pankreas, vornehmlich aber im Gehirn, dort vor allem im Nucleus arcuatus, exprimiert

[O'Donohue et al., 1982].

Durch „*in-situ-hybridisierung*“ und hochauflösende Zytogenetik konnte durch Zabel et al. 1983 und später Satoh und Mori et al. 1997 die **Position** des POMC-Gens im menschlichen Genom mit **Chromosom 2p23.3** genau bestimmt werden.

Mehrere Genom-Scans in verschiedenen ethnischen Gruppen zeigten im menschlichen Genom eine Kopplung von Serum-Leptin-Spiegeln mit dem Bereich des Chromosoms 2p, in dem das POMC-Gen liegt. Comuzzie et al. identifizierten bei 458 Amerikanern mexikanischer Herkunft aus zehn Familien über Kopplungsanalysen einen **quantitative-trait-locus** (QTL) im Bereich 2p21, der mit Plasma-Leptin-Spiegeln und Fettmasse in Verbindung stand [Comuzzie et al., 1997]. Hixson et al. bestätigten und konkretisierten die Ergebnisse von Comuzzie durch die Verwendung zusätzlicher Microsateliten in einer Kohorte von **337 Amerikanern mexikanischer Herkunft** [Hixson et al., 1999]. Die Arbeitsgruppe um Hager führte eine Kopplungsanalyse bei **158 französischen Familien** durch, von denen ein Familienmitglied einen BMI > 40 und ein weiteres Mitglied einen BMI von > 27 haben mußte. Aus dieser Analyse resultierten die **Chromosomen 10, 5 und 2** als mögliche Gen-Orte für Kandidatengene in Bezug auf Adipositas und erhöhte Plasma-Leptin-Spiegel [Hager et al., 1998]. Eine dritte ethnische Gruppe bestehend aus **Amerikanern afrikanischer Herkunft** wurde von Rotimi et al. untersucht und zeigte ebenfalls einen **quantitative-trait-locus** (QTL) auf Chromosom 2 in Bezug auf Plasma-Leptin-Spiegel [Rotimi et al., 1999].

Yaswen und seine Arbeitsgruppe kloneten 1999 eine **POMC-Knock-out-Maus**, die nicht in der Lage war, die Hormone ACTH, γ -Lipotropin, α -MSH, β -MSH, β -Endorphin zu synthetisieren. Diese Maus zeigte als **Phänotyp Adipositas**, eine fehlerhafte Entwicklung der Nebennieren und Hautfarbenveränderungen. Eine Behandlung dieser Knock-out-Mäuse mit einem stabilen alpha-melanozytenstimulierenden Hormon führte innerhalb von zwei Wochen zu einem **Gewichtsverlust** von **40%** des Ausgangsgewichts [Yaswen et al., 1999].

Da das **α -MSH** den natürliche Liganden für den Melanocortin-4-Rezeptor darstellt, ist dieser mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls in die Gewichtsregulation involviert. Huszar et al. berichteten 1997 von einer **MC4-Rezeptor Knock-out-Maus**, bei der sich phänotypisch eine Adipositas in Verbindung mit Hyperphagie, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und Insulinresistenz zeigte [Huszar et al., 1997].

Andererseits ließen sich bei nicht manipulierten Mäusen durch

intrazerebrale Gabe des starken **MC4-Rezeptor Agonisten MT-II** Nahrungsaufnahme und Adipositas eindrucksvoll senken [Fan et al., 1997].

Chagnon et al. zeigten in der **Quebec-Family-Studie** eine signifikante Assoziation zwischen einem Restriktions-Längen Polymorphismus des MC-4 Rezeptors und dem Phänotyp Adipositas [Chagnon et al., 1997]. 1998 wurden von den Arbeitsgruppen um Yeo und Vaisse verschiedene adipöse Patienten beschrieben, die eine **heterozygote Deletion** oder Insertion mit daraus resultierender Frame-Shift-Mutation in ihrem MC4-Rezeptor-Gen aufwiesen [Yeo et al., 1998; Vaisse et al., 1998; Hinney et al., 1999].

Die **Doppelrolle** von α -MSH in Bezug auf Regulation der **Nahrungsaufnahme** über den MC4-Rezeptor und Regulation der **Haut und Haarpigmentierung** über den MC1-Rezeptor ließ bei einem Defekt im POMC-Gen einen Phänotyp mit ACTH-Defizienz und zusätzlich Pigmentierungsstörungen sowie Fettleibigkeit erwarten.

Untersuchungen zweier Kinder mit dem Phänotyp Adipositas, roter Haarpigmentierung und ACTH-Defizienz führten 1998 zum Nachweis dreier Mutationen im POMC-Gen. Krude et al. identifizierten eine '**compound heterozygotie**' im **Exon 3** des POMC-Gens bei einem dreijährigen Mädchen und eine **homozygote Mutation** im **Exon 2** des POMC-Gens bei einem fünf Jahre alten Jungen.

Die drei Mutationen, ihre genetischen Auswirkungen und die phänotypische Auswirkung sind im folgenden einzeln dargestellt:

1. Patientin mit compound Heterozygotie :

- a) Ein **Guanin \rightarrow Thymin-Basenaustausch** im väterlichen Allel an Position **7013** nach Takahashi [Takahashi et al., 1983] führt zu einem Kettenabbruch bei Codon 79, was ein Fehlen von ACTH, α -MSH, β -Endorphin zur Folge hat.
- b) Eine **1-Bp-Deletion an Position 7133** [Takahashi et al., 1983] im mütterlichen Allel verursacht einen "Frameshift", der die Strukturen von ACTH und α -MSH, die zur Bindung am Rezeptor benötigt werden, unbrauchbar macht. Außerdem sorgt der „Frameshift“ für einen Kettenabbruch ab Codon 131.

Die Mutationsträgerin hatte ein normales Geburtsgewicht und entwickelte ab der dritten Lebenswoche eine Cholestase. Ab dem vierten Monat zeigte sich ein gesteigerter Appetit, der zu einer früh einsetzenden **Adipositas** führte. Die geistige Entwicklung des Mädchens ist zur Zeit des Berichts normal. Der Bruder des Mädchens, der ebenfalls Mutationsträger war, ist schon frühzeitig an Leberversagen mit Cholestase verstorben.

2. Patient mit Homozygotie :

Ein **Cytosin → Adenin-Basenaustausch** an Position **3804** [Takahashi et al., 1983] führt elf Basenpaare vor dem für das POMC kodierenden Bereich zu einem aus dem Leseraster verschobenen ATG-Basentriplet, was eine veränderte Initiierung der Ablesung des POMC-Gens zur Folge hat. Der Mutationsträger hatte nach der Geburt transiente **Hypoglykämien**. Sein Geburtsgewicht war normal. Eine sich ab dem fünften Lebensmonat entwickelnde Adipositas mit Hypoglykämie und Hyponatriämie führte über weitere Untersuchungen zur Diagnose einer Nebennierenrinden-Insuffizienz und eines **totalen ACTH-Mangels**. Durch Hydrokortison-Gaben sind die körperliche Entwicklung und die intellektuellen und emotionalen Fähigkeiten im Normbereich. Trotz der Behandlung kam es allerdings zu einem abnormalen Eßverhalten, was bei dem Jungen bis zum Alter von fünf Jahren zu einer ausgeprägten **Adipositas** führte.

Diese Ergebnisse repräsentieren die ersten Beispiele für einen genetischen Defekt im POMC-Gen und definieren eine neue **monogene endokrine Störung** bestehend aus frühauftretender Fettleibigkeit, Nebennierenrindeninsuffizienz und rötlich pigmentierter Körperbehaarung [Krude et al., 1998].

1.4. Hormonelle Regelkreise

1.4.1. Zentrale Mechanismen der Gewichtsregulation

Der **Hypothalamus** nimmt in bezug auf die Gewichtsregulation eine Schlüsselrolle ein. Er enthält vielfältige neuronale Systeme, die an der Energie-Homeostase beteiligt sind. Durch Tierversuche zwischen 1940-50 wurde eine Beteiligung des lateralen und ventromedialen Hypothalamus nachgewiesen. Zweiseitige Läsionen **im ventromedialen Hypothalamus** sorgten dabei für eine Hyperphagie und Fettsucht, während Defekte im **lateralen Hypothalamus** zu einer Verweigerung der Nahrungsaufnahme mit Todesfolge führten [Brobeck et al., 1943; Anand et al., 1951]. Seitdem wurde gezeigt, daß auch verschiedene andere Regionen wie z.B. der **Nucleus Arcuatus** (Bildungsort des **Proopiomelanocortins**) oder der Nucleus paraventricularis eng mit der Gewichtsregulation verbunden sind. Bis heute ist nicht genau bekannt, auf welchem komplexen Weg diese diversen Gehirnbereiche interagieren, allerdings ist sicher, daß es nicht nur ein einziges „Gewichtszentrum“ gibt, wie es lange Zeit angenommen wurden. Die verschiedenen Zentren der Gewichtsregulation stehen durch verschiedene Neurotransmitter und Hormone miteinander in Verbindung.

Neuropeptid Y (NPY) kommt von allen Hormonen am verbreitetsten im Gehirn vor. Axone von NPY Zellkörpern im Nucleus Arcuatus projizieren zum Nucleus paraventricularis [O'Donohue et al., 1985]. Applikationen von NPY in diesen Bereich, in dem die Neuropeptid Y Rezeptoren (Y1 und Y2) vorkommen, führen durch eine Reduzierung der Thermogenese, Erhöhung der Lipoprotein-Lipase-Aktivität und einer Stimulation der Insulin- und Glukokortikoid-Sekretion [Moltz et al., 1985; Albers et al., 1990] zu einer positiven Energiebilanz und einem Anstieg der Fettspeicher [Stanley et al., 1986].

Physiologischerweise ist die NPY-Konzentration in Situationen, die mit Gewichtsverlust einhergehen, wie z.B. **Fasten, Stillen** oder **starke körperliche Betätigung**, erhöht [Lewis et al., 1993; Smith et al., 1993]. Ebenso findet bei ob/ob-Mäusen und db/db-Mäusen eine Überproduktion von NPY im Nucleus Arcuatus statt. Zusammengenommen lassen diese Erkenntnisse vermuten, daß die NPY-Produktion durch einen negativen '**Feedback-Mechanismus**' von Insulin und Leptin inhibiert wird [Flier et al., 1997; Schwartz et al., 1997]. Bei Gewichtsverlust oder fehlender Leptin-Produktion bei ob/ob-Mäusen bzw. fehlendem Rezeptor bei db/db-Mäusen ist die

Leptin-Konzentration erniedrigt, was zu einer Aktivierung der NPY- Produktion im Nucleus Arcuatus führt.

Ein weiteres Hormon, das an der zentralen Gewichtsregulation beteiligt ist, ist das **Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)**, welches im **Nucleus Paraventricularis** synthetisiert wird und die Gen-Expression von Proopiomelanocortin (POMC), der Matrize für **Adrenocorticotropin (ACTH)**, steuert [Dallmann et al., 1993]. Zentrale Gabe des CRH reduziert die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht, und endogenes CRH ist wahrscheinlich an körperlichen Reaktionen bei Streß und Krankheit beteiligt [Rothwell et al., 1996; Spina et al., 1996]. Durch Leptingabe wird die CRH-Sekretion gesteigert, durch Glucocorticoidgabe verringert [Mercer et al., 1996; Schwartz et al., 1996; Seeley et al., 1996].

Das durch das CRH gesteuerte POMC hat neben ACTH, β -Endorphin und verschiedenen Lipotropinen (LPH) auch unterschiedliche Melanocortine als Genprodukte. Dem **α -Melanocortin (α -MSH)** kommt dabei in puncto Gewichtsregulation die größte Bedeutung zu. Es wird fast ausschließlich in Neuronen des Nucleus Arcuatus exprimiert und steht mit den paraventrikulären Kernen in Verbindung [Kiss et al., 1984]. Im Bereich um den Nucleus Paraventricularis wird auch der **Melanocortin-4-(MC4) Rezeptor** vornehmlich produziert und stellt dort die Zielstruktur mit der höchsten Affinität für α -MSH dar [Fan et al., 1997; Mountjoy et al., 1994]. Genetische Defekte des MC4-Rezeptors führen bei Mäusen zu **Hyperphagie und Adipositas** [Cone et al., 1996; Huszar et al., 1997]. Beim Menschen beschreiben mehrere Studien Zusammenhänge zwischen Mutationen im MC4-Rezeptor und dem Phänotyp Adipositas [Yeo et al., 1998; Vaisse et al., 1998; Hinney et al., 1999; Sina et al., 1999; Vaisse et al., 2000; Farooqi et al., 2000].

Ebenso verursacht eine **pharmakologische Blockade** des MC4-Rezeptors mit Hilfe eines Agouti-Proteins bei Mäusen Übergewicht und Haarfarbeveränderungen. Der Einfluß des Melanocortin-Systems auf die Gewichtsregulation scheint ein Gegengewicht zu den NPY-Effekten darzustellen. Gewichtsabnahme durch Fasten führt zu reduzierten POMC-m- RNA-Konzentrationen im Nucleus Arcuatus [Schwartz et al., 1997]. Dies könnte die Konsequenz der erniedrigten Leptin-Spiegel sein, da auch bei ob/ob-Mäusen die POMC-m-RNA-Konzentrationen erniedrigt ist und dieser Effekt bei Leptingabe verschwindet [Schwartz et al., 1997].

1.4.2. Periphere Regulation von Nahrungsaufnahme und Sättigung

Das periphere System reagiert in Form einer kaskadenartigen Ausschüttung gastrointestinaler Hormone als Antwort auf Nahrungsaufnahme. Nahrungsbestandteile im Magen-Darm-Trakt werden dabei chemisch registriert. Danach beeinflussen verschiedene Hormone die Motilität des Magen-Darm-Trakts und signalisieren dem Gehirn, die Nahrungsaufnahme zu stoppen [Hirschberg et al., 1998].

Cholecystokinin (CCK) wurde als erstes aus der Gruppe der Sättigungsfaktoren isoliert und am intensivsten untersucht. Neben der Sättigung vermittelt Cholecystokinin (CCK) eine Gallenblasen-Kontraktion, eine exokrine Sekretion der Verdauungssäfte des Pankreas und verlangsamt die Magenentleerung [Mutt et al., 1988]. Cholecystokinin (CCK) wird vom Intestinal-Trakt ausgeschüttet und bindet dann an **CCK-A-Rezeptoren** im Magen unter Aktivierung afferenter Fasern des **Nervus Vagus**, die wiederum die Information zum **Traktus solitarius** im Hirnstamm vermitteln. Von dort besteht über die parabrachialen Kerne eine Verbindung zum ventromedialen Hypothalamus und den paraventriculären Kernen. Periphere und zentrale Cholecystokinin-Mechanismen interagieren also miteinander. Eine Stimulation von CCK-A-Rezeptoren im Pylorus-Bereich des Magens führen zur Kontraktion des Sphinkters und verhindern so eine Magenentleerung. Bei einer Vagotomie oder Blockade der CCK-A-Rezeptoren fehlen sämtliche CCK-Effekte bezüglich der Nahrungsaufnahme [Smith et al., 1981; Moran et al., 1992].

Andere gastrointestinale Hormone wie **Somatostatin** und **Glukagon** verringern ebenso die Nahrungsaufnahme. Da Somatostatin die Magenentleerung verzögert, wird vermutet, daß dieses Hormon für eine durch die Magendehnung vermittelte Reduzierung der Nahrungsaufnahme verantwortlich ist [Pirke et al., 1994].

Die Glukagon-Wirkung auf die Nahrungsaufnahme scheint über glukosensitive Zellen in der Leber [Ritter et al., 1986] und den Nervus Vagus abzulaufen [Geary et al., 1983]. Speziell die Aufnahme von Proteinen wird durch Glukagon gehemmt [Bray et al., 1992]. Daneben gibt es Anzeichen für einen Einfluß auf die Körpertemperatur mit damit verbundener Energieumsatzänderung [Billington et al., 1991].

Das vom Inselapparat des Pankreas gebildete **Insulin** beeinflusst Appetit und Nahrungsaufnahme in komplexer Art und Weise. Plötzliche Insulin-Gabe führt zu Hypoglykämie und einer Steigerung der Nahrungsaufnahme. Diese Reaktionen werden über Mechanismen, die sowohl in der Leber als auch im ZNS stattfinden, vermittelt.

Chronische Insulin-Applikation in niedrigen Dosen hingegen reduziert bei gleichzeitiger Normo- oder Hyperglykämie die Nahrungsaufnahme [Vanderweele et al., 1980]. Man vermutet deshalb, daß physiologische Insulin-Plasma-Spiegel einen Sensor des peripheren metabolischen Status repräsentieren [Woods et al., 1985]. Diese Vermutung wird durch die klinischen Erfahrungen einer positiven Korrelation von Insulin-Plasma-Spiegel und Grad der Adipositas erhärtet. Chronisch erhöhte Insulin-Plasma-Spiegel könnten somit ein Sättigungssignal für das **ZNS** darstellen, Nahrungsaufnahme und Körpergewicht zu reduzieren.

Grundsätzlich müssen kurzfristige und langfristige Regulatoren in der hormonellen Steuerung der Nahrungsaufnahme und Sättigung unterschieden werden. Die Ausschüttung eines **kurzfristigen Regulators** wird durch Nahrungsaufnahme ausgelöst und steuert den Appetit während jeder einzelnen Mahlzeit. Ein kurzfristiger Regulator hat geringen oder gar keinen Einfluß auf das Körpergewicht. Die Sekretion eines **langfristigen Regulators** ist nicht notwendigerweise von der Nahrungsaufnahme abhängig. Er beeinflusst nicht nur den Appetit, sondern vermittelt auch tiefergreifende metabolische Effekte.

Ein typischer kurzfristiger Regulator ist das CCK. In Tierexperimenten verkürzte **CCK-8 Applikation** die Länge der Mahlzeit. Es wird vermutet, daß das CCK eine verfrühtes Sättigungsgefühl auslöst und damit die Nahrungsaufnahme verkürzt [Gibbs et al., 1986]. Beim Menschen korreliert die CCK-Sekretion nach Nahrungsaufnahme positiv mit einem **Sättigungs-** und negativ mit einem **Hungergefühl** [Geraciotti et al., 1988, Hirschberg et al., 1994]. Die Höhe der CCK Sekretion steht außerdem in Relation zur Kalorienmenge der aufgenommenen Nahrung. Bei Patienten mit Eßstörungen ist die nahrungsvermittelte CCK-Ausschüttung gestört [Geraciotti et al., 1988, Phillipp et al., 1991]. CCK ist somit ein wichtiger endogener Appetitregulator während einer Mahlzeit. Zu einem Gewichtsverlust führt allerdings auch eine chronische CCK-Applikation nicht, da sich zwar die Länge der einzelnen Mahlzeiten verkürzt, die Anzahl der Mahlzeiten sich aber im gleichen Maße erhöht und es somit im Endeffekt zur gleichen Menge an aufgenommener Nahrung kommt [West et al., 1984].

Zu den langfristigen Regulatoren der Nahrungsaufnahme gehören verschiedenste Hormone. Sie beeinflussen sowohl den **Energiemetabolismus** als auch den Appetit. Sexual-Hormone und Glukokortikoide gehören z.B. zu diesen langfristigen

Regulatoren. Eine Ovarialektomie bei Ratten führt zu einer Hyperphagie und Gewichtszunahme. Andererseits setzt eine kontinuierliche **Östrogen**-Gabe die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht herab [Wade et al., 1979]. Es wird vermutet, daß das Östrogen die Aktivität des anorektisch wirkenden Corticotropin Releasing Hormons (CRH) im Nucleus Paraventricularis erhöht und gleichzeitig an gleicher Stelle Produktion und Ausschüttung von Neuropeptid Y unterdrückt [Bonavera et al., 1994].

Testosteron stimuliert die Nahrungsaufnahme und dämpft die Aktivität der **Lipoprotein-Lipase** (LPL) im viszeralen Fettgewebe mittels spezifischer Androgen Rezeptoren. Außerdem wird durch Testosteron die Expression von **β-adrenergen-Rezeptoren** verstärkt, was eine Katecholamin induzierte Lipid-Mobilisation bewirkt [Rebuffe-Scrive et al., 1991]. Als Konsequenz der Testosteron-Wirkungen ist die bei Männern mit dem Alter ansteigende abdominale Fettmasse bei sinkenden Testosteron-Spiegeln zu sehen [Seidell et al., 1990]. Im Gegensatz dazu ist bei Frauen mit zunehmendem Alter ein Ansteigen des Testosteron-Spiegels und der abdominellen Fettmasse zu beobachten [Evand et al., 1983]. Dieser widersprüchliche Verlauf scheint aber in der bei älteren Frauen meist reduzierten Sekretion von Östrogen und Progesteron begründet zu sein [Laatikainen et al., 1980].

Glukokortikoide verhindern die Produktion des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) und potenzieren im Hypothalamus die durch Noradrenalin vermittelte Steigerung der Nahrungsaufnahme [Leibowitz et al., 1986]. Des weiteren sind Glukokortikoide mit einer vermehrten Speicherung von abdominalem Fett und einem erhöhten Proteinkatabolismus assoziiert, wie man z. B. beim **Morbus Cushing** beobachten kann [Baxter et al., 1979].

Insgesamt scheinen die Einflüsse von Steroidhormonen auf die Gewichtsregulation hauptsächlich durch periphere metabolische Effekte im Fettgewebe vermittelt zu werden. Steroide regulieren die Aktivität der **Lipoprotein-Lipase** (LPL), die für die Speicherung von Triglyceriden im Fettgewebe verantwortlich ist. Hierbei ist eine Abhängigkeit der Steroide vom Insulin zu beobachten [Xu et al., 1990]. **Insulin** und **Leptin** gehören ebenso in die Gruppe der langfristige Regulatoren für Nahrungsaufnahme und Körpergewicht. Auf beide Hormone wurde in den Kapiteln 1.2.3 und 1.3.1 genauer eingegangen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patientenrekrutierung

Für Studien zur Regulation des Körpergewichts wurden **96 extrem übergewichtige Kinder und Jugendliche** in folgenden Kliniken rekrutiert:

- 1) **Klinik Hochried**, Murnau (Spezialklinik zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit extremer Adipositas)
- 2) **Adipositas Rehabilitationszentrum INSULA**, Berchtesgaden
(Langzeittherapie für Jugendliche mit extremer Adipositas)

Die **Voraussetzungen** für die Aufnahme in die Studie waren:

- 1) frühmanifeste und extreme Adipositas,
- 2) BMI \geq 90. Altersperzentil,
- 3) keine organischen Erkrankungen,
- 4) Zigarettenkonsum < 10 Zigaretten pro Tag.

Um Familienuntersuchungen durchführen zu können, wurden wenn möglich auch die Eltern der Probanden rekrutiert.

Als **Kontrollgruppe** wurden **60 untergewichtige Studenten** der Philipps-Universität Marburg mit folgenden Kriterien rekrutiert:

- 1) BMI < 19. Altersperzentil liegen,
- 2) keine somatischen Störungen
- 3) Zigarettenkonsum < 10 Zigaretten pro Tag.

Sämtliche Probanden wurden von Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe rekrutiert. Als Untersuchungsgut dient EDTA-Blut, aus dem DNA für die Untersuchungen gewonnen wird.

2.2. Chemikalien

Alle gebräuchlichen Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Sigma, Steinbach; Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande; Riedel-de Haen, Seelze und Braun, Melsungen bezogen.

Tabelle 3: Spezielle Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Chemikalie	Firma, Ort, Land
Acrylamid plusone 40 % PAGE (Acryl)	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Acrylease	Statogene, Heidelberg, D
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, D
123 Bp DNA Ladder	GibcoBrL (Life Technologies),
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
dNTP-Mix	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Long Ranger 50 %	FMC, Rockland, USA
low DNA Mass Ladder	Gibco BRL, Eggenstein, D
Methylenbisacrylamid plusone 2 % (Bis)	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Polyethyleneglycol 600 (PEG 600)	Sigma, Deisenhofen, D
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, D
Sequenzierungskit	Amersham, Pharmacia, Biotech, Freiburg, D
Sodiumdodecylsulphat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Steinbach, D
TrisHCl	USB, Cleveland, USA
Urea plusone (Harnstoff)	Amersham, Pharmacia, Biotech, Freiburg, D
Xylenzyanol	Merck, Darmstadt, D

2.2.1. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser (Bidest) angesetzt.

2.2.1.1. Puffer

Tabelle 4: Red cell lysis buffer (RCLB), pH 7,6

Reagenz	Stammkonzentration	g/1000 ml Bidest
TrisHCl	10 mM	1,21
MgCl ₂	5 mM	1,02
NaCl	10 mM	0,58

Tabelle 5: SE-Puffer (pH 8)

Reagenz	Stammkonzentration	g/1000 ml Bidest
NaCl	75 mM	4,39
Na ₂ EDTA	25 mM	8,41

Tabelle 6: TE-Puffer (pH 8)

Reagenz	Stammkonzentration	g/1000 ml Bidest
TrisHCl	10 mM	1,21
Na ₂ EDTA	1 mM	0,34

Tabelle 7: TAE-Puffer

Reagenz	Konzentration
TrisHCl	0,04 M
Eisessig	0,114 %
EDTA	0,01 M

Tabelle 8: 10 x TBE-Puffer (pH 8)

Reagenz	Menge pro Liter
TrisHCl	154,5 g
Borat	26,2 g
Na ₂ -EDTA	9 g
Bidest	810 g (einwiegen)

Tabelle 9: Gel-Ladungspuffer**a) für Agarose-Gele**

Reagenz	Konzentration
Bromphenolblau	0,25 %
Xylenzyanolblau	0,25 %
Ficoll	15 %

b) für SSCA-Gele

Reagenz	Konzentration
EDTA (0,5 M)	40 %
Formamid, deionisiert	20 %
Glyzerin	10 %
Bromphenolblau	0,5 %
Xylenzyanolblau	0,5 %

Tabelle 10: 10 x PCR-Puffer

Puffer-Nr.	TrisHCl (mM)	pH	MgCl ₂ (mM)	KCl (mM)
1	100	8,3	15	250
2	100	8,3	15	750
3	100	8,3	35	250
4	100	8,3	35	750
5	100	8,8	15	250
6	100	8,8	15	750
7	100	8,8	35	250
8	100	8,8	35	750
9	100	9,2	15	250
10	100	9,2	15	750
11	100	9,2	35	250
12	100	9,2	35	750

2.2.1.2. Sonstige Lösungen

Tabelle 11: Pronase-Reaktionsmix

Reagenz	eingesetzte Menge
SE-Puffer	5 ml
Pronase E (10 mg/ml)	25 µl
SDS (10 %)	500 µl

Tabelle 12: Master-Mix

Reagenz	Konzentration
TrisHCl (pH 8)	20 mM
EDTA (pH 8)	250 nM

2.2.1.3. Lösungen zum Färben

Tabelle 13: Lösungen zum Färben**a) der Agarose-Gele**

Reagenz	Konzentration
Ethidiumbromid (1 %)	10 mg/ml

b) der SSCA-Gele

Reagenz	Konzentration
AgNO ₃	120 mM
NaCO ₃	1,4 M

2.2.2. Enzyme

Tabelle 14: Restriktionsenzyme

Enzym	Konzentration	Erkennungssequenz	Puffer	Herkunft
Hin 1 I	10 U/µl	5'...G Pu↓C G Py C...3' 3'...C Py G C↑Pu G...5'	Violett	Haemophilus influenzae RFL 1
Eco 81 I	8-12 U/µl	5'...CC↓TNAGG...3' 3'...GGANT↑CC...5'	Gelb	Escherichia coli RFL 81
Msp 17 I	8-12 U/µl	5'...G Pu↓C G Py C...3' 3'...C Py G C↑Pu G...5'	Grün	Moxarella species 17

Die Restriktionsenzyme wurden alle von der Firma Eurogentec Bel S.A., Seraing, Belgien bezogen.

Tabelle 15: Sonstige Enzyme

Enzym	Konzentration	Hersteller
Taq-Polymerase	4 U/µl	MWG, Ebersberg, D
Pronase E	10 mg/ml	Sigma, Deisenhofen, D

2.2.3. Primer

Alle Primer wurden von MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 16: Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung von POMC-Fragmenten

Name	Sequenz	Größe
POMC XF	5'-TAG GGG TGG CTA GAT GGC-3'	18-Basen
POMC XR	5'-TCA CTG CGC CTA GGC CCT-3'	18-Basen
POMC 2F	5'-TGG TGA GTG GCC AAC ATT-3'	18-Basen
POMC 2R	5'-GTC CCA GTC CCA TCT AAT-3'	18-Basen
POMC 3a2F	5'-CAT GCC CTC GCG TCT TC-3'	17-Basen
POMC 3a2R	5'-GAG TCG CTG GCC AGT CA-3'	17-Basen
POMC 3bF	5'-TGG AGT TCA AGA GGG AGC-3'	18-Basen
POMC 3bR	5'-CTA CCG CAT GGA AAC CAC-3'	18-Basen
POMC 3a2F-700	5'-CAT GCC CTC GCG TCT TC-3'	17-Basen
POMC 3a2R-800	5'-GAG TCG CTG GCC AGT CA-3'	17-Basen
POMC 3bF-700	5'-TGG AGT TCA AGA GGG AGC-3'	18-Basen
POMC 3bR-800	5'-CTA CCG CAT GGA AAC CAC-3'	18-Basen

Die Konzentration lag bei allen oben aufgeführten Primern bei 25 pmol/µl

2.3. Geräte

Tabelle 17: Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller, Ort, Land	Funktion
ABI Sequencer 373	ABI, Weiterstadt, D	automatische Sequenzierung
Biofuge 13	Heraeus, Hanau, D	Zentrifuge
Drehschieberpumpe RZ-2	Vacuubrand, Gießen, D	Vakuumtrocknen von SSCA-Gelen oder Sequenzproben
Finn-Pipetten	Labsystem, Helsinki, Finnland	Pipette

Material und Methoden

Gerätebezeichnung	Hersteller, Ort, Land	Funktion
GDS-Kamera-System	Polaroid, Offenbach, D	Kamera
Gelapparat 41 cm	MWG, Ebersbach, D	Halterung für Sequenzgel
Geneamp PCR-System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt, D	DNA-Thermocycler
Geneamp PCR-System 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt, D	DNA-Thermocycler
Genequant II	Pharmacia, Freiburg, D	Photometer
Horizontalelektrophorese GE-A2	AGS, Heidelberg, D	Agarose-Gelelektrophorese
Labofuge	Heraeus, Hanau, D	Zentrifuge
Laborwaage SBA,SBC	Scaltec Instruments, Heiligenstadt, D	Waage
Li-cor Sequenzer 4200	MWG, Ebersbach, D	Sequenzierung
Magnetrührer mit Heizung	IKA, Wilington, USA	Magnetrührer
Megafuge	Heraeus, Hanau, D	Kühlzentrifuge
Mighty Bright	Hoefer, San Francisco, USA	UV-Lichtquelle
Mikroliterspritze 802, 25	Hamilton, Bonaduz, Schweiz	Probenauftrag auf SSCA-Gele
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg, D	Mikrowelle
Milli-RO 10 Milli Q Plus	Millipore, Saint-Quentin Ivelines Codex, Frankreich	Destillierungs-Anlage
Minishaker MS1	IKA, Wilington, USA	Schüttler

Gerätebezeichnung	Hersteller, Ort, Land	Funktion
Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D	Pipetten-Ansauggerät
Power-Supply E 452	Consort, Turnhout, Belgien	Spannungs- und Stromversorgung
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel, D	Schüttelwasserbad
Scotsman AF 10	Frimont, Mailand, Italien	Eismaschine
Touch Down	MWG, Ebersberg, D	DNA-Thermocycler
Vertikalelektrophorese SE 600	Hoefer, San Francisco, USA	SSCA-Elektrophorese
Vortex	IKA Works, Staufen, D	Minischüttler

2.4. DNA-Extraktion

Um bestimmte **DNA-Fragmente** mittels PCR amplifizieren zu können, mußte die DNA zunächst aus dem Untersuchungsmaterial extrahiert werden. Dazu kann theoretisch jede Zelle verwendet werden, sofern sie einen Zellkern besitzt. In unserem Fall wurde die DNA aus den **Leukozyten** des Blutes gewonnen.

2.4.1. Durchführung der DNA-Extraktion

Die Durchführung erfolgte entsprechend einem modifizierten Protokoll von Miller et al. [1988].

Dieses Protokoll ist für **10-25 ml Vollblut** geeignet. Zur DNA-Isolierung kann sowohl natives als auch tiefgefrorenes Vollblut verwendet werden. Eine höhere DNA Ausbeute ist jedoch mit nativem Blut zu erwarten.

In einem 50 ml Falcon-Tube wurden 10-20 ml Vollblut mit 30 ml eiskaltem Lysepuffer vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse der Erythrozyten wurden die Leukozyten durch 10-minütige **Zentrifugation** bei 4°C und 4000 rpm (Ausschwingrotor #8155, Heraeus Megafuge 2.0 R) sedimentiert. Der Überstand wurde durch **Dekantieren** verworfen und das verbleibende Leukozytensediment mit 25 ml

Lysepuffer gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Das Pellet wurde in 5,5 ml Aufnahmepuffer aufgelöst und über einen Zeitraum von 10-12 h bei 37°C schüttelnd im Wasserbad inkubiert. Um den proteolytischen Abbau weiter zu verstärken, schloß sich nach Zugabe von 5 ml Aufnahmepuffer eine weitere **Inkubation** für mindestens 10 min bei 55°C an. Die nun klare Lösung wurde mit 2,5 ml 5 M NaCl aufgefüllt und nach intensiver Durchmischung 15 min bei RT wie oben zentrifugiert. Der **Überstand** wurde in ein neues Falcon-Tube überführt und die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen abs. Ethanol gefällt. Die gefällte DNA konnte mit einem Glashaken aufgenommen und nach Schwenkung in 70 % Ethanol in TE-Puffer pH 8,0 bei 50° C 1 - 2 h im Wasserbad gelöst werden. Abschließend folgte eine **photometrische Konzentrationsbestimmung** der DNA im Spektralphotometer.

2.4.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der im TE-Puffer gelösten DNA wurde photometrisch in Quarzküvetten mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von **260 nm** bestimmt. Dazu wurde die DNA zunächst 1:200 verdünnt und die **Extinktion** dieser Lösung mit Hilfe eines Photometers gemessen. Die DNA-Konzentration läßt sich dann nach folgender Formel berechnen:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Extinktion}_{260 \text{ nm}}$$

Die DNA-Konzentration liegt üblicherweise zwischen 300 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ und der Quotient DNA / Protein sollte mindestens 1,5 betragen.

2.4.3. Verdünnungen und Lagerung

Um die DNA in die PCR einsetzen zu können, mußten Verdünnungen hergestellt werden, so daß die DNA-Konzentration **100 ng/ μl** betrug. Die Lagerung der DNA-Proben bei -20 bis -80° C machte eine Lagerung und Verwendung der Proben für mehr als 6 Monate möglich. Zur einfacheren Verarbeitung der Proben verteilte man die DNA-Verdünnungen auf **Mikrotiterplatten**. In jedes der 96 Wells einer Mikrotiterplatte wurden 6 μl DNA-Verdünnung und 25 μl aq injectabile pipettiert und bei -20 °C tiefgefroren. Die Endkonzentration der DNA betrug in den Wells etwa 20 ng/ μl .

2.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.5.1. Allgemeines Verfahren der PCR

Die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde 1985 zum erstenmal publiziert und wird seit 1987 kommerziell angeboten [Schimmel et al., 1990].

Sie wurde von K. Mullis und Mitarbeitern der Firma Cetus in Kalifornien 1983 entwickelt und ist im Grunde genommen eine *in-vitro*

Imitation des natürlichen zelleigenen DNA-Replikationsmechanismus, wie er in jedem Zellteilungszyklus vorkommt.

Die Replikation erfolgt allerdings bei der PCR um das vielfache häufiger und ist spezifisch auf einen DNA-Abschnitt beschränkt.

Das Prinzip der DNA-Amplifikation beruht auf der **zyklischen Wiederholung** von drei Schritten, die in Abbildung 5 schematisch dargestellt sind:

1. **Trennung** der beiden komplementären DNA Doppelstränge durch Denaturierung bei 94°C.
2. **Anlagerung** (Hybridisierung) von zwei zum jeweiligen Einzelstrang komplementären **Oligonukleotid-Primern** an die beiden Einzelstränge bei einer 'Annealing'-Temperatur, die je nach Art und Länge des Primers unterschiedlich ist, aber meistens zwischen 50-60°C liegt. Diese Primer sind synthetisch hergestellte DNA Stücke von ca. 20 Nukleotiden Länge, die von ihrer Basenabfolge so entworfen worden sind, daß sie in den jeweiligen Grenzregionen des zu amplifizierenden Genabschnitts an den Einzelsträngen binden und damit den

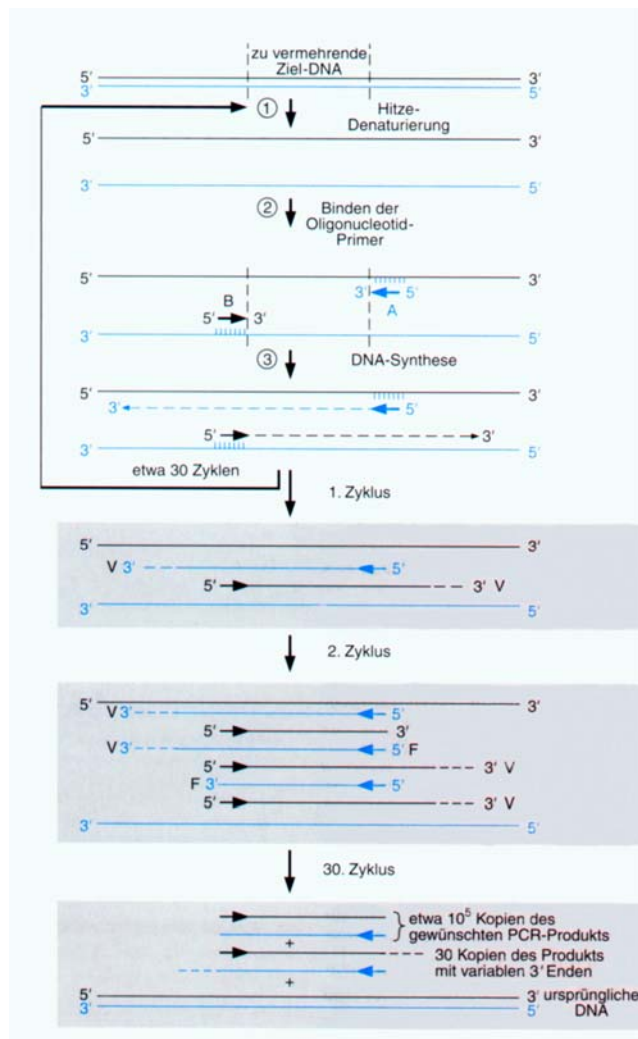


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der Polymerase-Chain-Reaktion

Abbildung modifiziert nach Strachan et al., 1996

Startpunkt und die Richtung der Amplifikation bestimmen.

3. **Synthese** der fehlenden komplementären Genabschnitte an das 3'OH-Ende des Primers. Die Synthese erfolgt entlang der beiden DNA Einzelstränge mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase deren **Temperaturoptimum** bei etwa **72°C** liegt. Die DNA-Polymerase selbst ist nur in der Lage, komplementäre Nukleotide an einen DNA-Einzelstrang zu addieren, und benötigt zur Initiierung die oben bereits beschriebenen Primer. Nach Beendigung des **1. Zyklus** liegt somit die Kopie des DNA Doppelstranges im Bereich des gewählten Genbereiches vor. Diese Kopie und die Original-DNA dienen in den folgenden Zyklen, die entsprechend dem ersten Durchgang ablaufen, als **Matrize** zur weiteren DNA-Synthese. Somit vervielfältigt sich mit jedem Zyklus die ausgewählte Sequenz. Es findet bei n-Zyklen eine exponentielle Amplifikation auf das **2ⁿ-fache** der Start DNA-Menge statt.

Zusätzlich zu DNA und Polymerase benötigt die Reaktion noch ein individuelles **Reaktionsmix**, in dem eine ausreichende Menge beider Primer, die vier Desoxynukleosidtriphosphate, Puffer (siehe Tab. 8) und die der jeweiligen PCR angepaßten Zusätze (Tab. 10) enthalten sind.

2.5.2. Etablierung der PCR für das POMC-Gen

2.5.2.1. Primerdesign

Für die Amplifikation des POMC-Gens wurden entsprechende Oligonukleotid-Primer mit Hilfe eines frei zugänglichen online-Programms am Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi) unter Berücksichtigung folgenden Punkte kreiert und bestellt [Rychlik, 1993]:

- **Vermeidung** von mehr als drei Guanosin- oder Cytosin-Nukleotiden am 3' Ende des Oligonukleotid-Primers.
- **Keine komplementären Sequenzen** zwischen dem Primerpaar und innerhalb des Primers zur Vermeidung von Primerdimerbildung oder Rückfaltung des Primers durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung.
- Die **Größe** des Oligonukleotid-Primers sollte mindestens 19 Bp betragen.
- Der **G/C-Gehalt** des Oligonukleotid-Primers sollte zwischen 40 % und 60 % liegen.

2.5.2.2. Optimierung der PCR

Die erfolgreiche Durchführung nachfolgender Applikationen wie z.B. Mutationsdetektion oder Sequenzierung erfordert ein spezifisches Amplifikat möglichst ohne nicht-spezifische PCR-Produkte. Deshalb wurden verschiedene, nachfolgende Parameter, die einen Einfluß auf die Spezifität und Effektivität besitzen, in der PCR variiert.

Ionenkonzentration und pH-Wert

Die **Denaturierung** der DNA und die Temperatur zur Anlagerung der Oligonukleotid-Primer ('Annealing-Temperatur') werden durch die Höhe der **Ionenkonzentration**, vor allem die der K^+ -und Mg^{2+} - Ionen, und des pH-Wertes beeinflusst. Zusätzlich haben diese Faktoren einen Einfluß auf die **enzymatische Aktivität** der Polymerase. Kationen schwächen durch Anlagerung an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Desoxyribose-Rückgrads die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen DNA-Strängen, so daß die Anlagerung des Primers an die Matrize verstärkt wird.

Um die **optimale K^+ - und Mg^{2+} -Ionenkonzentration** sowie den pH-Wert, der je nach Zielsequenz und Oligonukleotid-Primer verschieden ist, herauszufinden, ging man wie folgt vor:

- a) Zur **Bestimmung** des optimalen PCR-Puffers führte man eine PCR durch, bei der die 12 verschiedenen **10 x PCR-Puffer** (Tabelle 9) mit derselben DNA-Probe getestet wurden. Danach konnte der Puffer, der das beste Ergebnis zeigte, entweder direkt verwendet, oder, falls das Produkt noch unspezifisch war, mit den 5 Zusätzen weiterer PCR-Optimierung (siehe Tabelle 17) zugeführt werden. Dabei war dann entsprechend weniger Wasser einzusetzen.

Tabelle 18: Chemikalien zur weiteren PCR-Optimierung

Ausgangslösung	Eingesetzte Menge pro 25 µl Ansatz	Konzentration im PCR- Reaktionsmix
Formamid (100 %)	1,25 µl	5 %
DMSO (100 %)	1,25 µl	5 %
Glycerol (100 %)	3,75 µl	15 %
$(NH_4)_2SO_4$ (375 mM)	1,0 µl	15 mM
BSA (20 mg/ml)	1,5 µl	1,28 mg/ml

- b) Eine **Alternative** bestand darin, den vom Hersteller der Taq-Polymerase (MWG) mitgelieferten 10 x-PCR-Puffer mit verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen zu optimieren.

Ermittlung von 'Annealing-Temperatur' und Primerkonzentration

Zur Berechnung der '**Annealing-Temperatur**' der Primer wurde die 2+4 Regel verwendet (Im Idealfall sollte die 'annealing temperature' von Forward- und Reverse-Primer übereinstimmen.): $2 \times n_A + 2 \times n_T + 4 \times n_C + 4 \times n_G = T_M$

n_A Anzahl der A in einem Primer

n_T Anzahl der T in einem Primer

n_C Anzahl der C in einem Primer

n_G Anzahl der G in einem Primer

T_M Schmelzpunkt des Primers

Zur **Optimierung** erhöhte man die 'Annealing-Temperatur' in 1°C-Schritten und/oder reduzierten die 'Annealing-Zeit' von 30 sek bis auf 15 sek so lange, bis man ein spezifisches PCR-Produkt erhielt.

2.5.2.3. Durchführung

Die Reagenzien für die jeweilige PCR wurden, abhängig von den jeweiligen Primern, auf Eis nach folgenden **Grundschemata**, zu denen man durch die Optimierung gelangt war, zusammenpipettiert (Wichtig: Die Taq-Polymerase durfte jeweils erst zuletzt zugegeben werden, um eine unspezifische Amplifikation zu vermeiden.):

Tabelle 19: PCR-Reagenzien für POMC-Fragment 2

Ausgangslösung	Konzentration der Ausgangslösung	eingesetzte Menge pro 25 µl-Ansatz	Konzentration im PCR-Reaktionsmix
Forward-Primer POMC 2	50 pmol/µl	0,25 µl	1 pmol/µl
Reverse-Primer POMC 2	50 pmol/µl	0,5 µl	1 pmol/µl
10 x PCR-Puffer Nr.: 4	100 %	2,5 µl	10 %
Mastermix	100 %	0,5 µl	10 %
DNTP-Mix	200 mM	0,25 µl	2 mM
DNA (Mikrotiterplatte)	20 ng/µl	2,5 µl	2 ng/ µl
Taq-Polymerase	4 U/µl	0,1 µl	0,016 U/µl
A. dest.		18,4 µl	

Tabelle 20: PCR- Reagenzien für POMC-Fragment 3a2

Ausgangslösung	Konzentration der Ausgangslösung	Eingesetzte Menge pro 25 µl-Ansatz	Konzentration im PCR-Reaktions-Mix
Forward-Primer POMC 3a2	50 pmol/µl	0,5 µl	1 pmol/µl
Reverse-Primer POMC 3a2	50 pmol/µl	0,5 µl	1 pmol/µl
10 x PCR-Puffer Nr.: 9	100 %	2,5 µl	10 %
Mastermix	100 %	0,5 µl	10 %
DNTP-Mix	200 mM	0,25 µl	2 mM
DNA (Mikrotiterplatte)	20 ng/µl	2,5 µl	2 ng/ µl
Taq-Polymerase	4 U/µl	0,1 µl	0,016 U/µl
A. dest.		18,15 µl	

Tabelle 21: PCR- Reagenzien für POMC-Fragment 3b

Ausgangslösung	Konzentration der Ausgangslösung	eingesetzte Menge pro 25 µl-Ansatz	Konzentration im PCR-Reaktions-Mix
Forward-Primer POMC 3b	50 pmol/µl	0,5 µl	1 pmol/µl
Reverse-Primer POMC 3b	50 pmol/µl	0,5 µl	1 pmol/µl
10 x PCR-Puffer Nr.:1	100 %	2,5 µl	10 %
Mastermix	100 %	0,5 µl	10 %
DNTP-Mix	200 mM	0,25 µl	2 mM
DNA (Mikrotiterplatte)	20 ng/µl	2,5 µl	2 ng/ µl
Taq-Polymerase	4 U/µl	0,1 µl	0,016 U/µl
A. dest.		18,15 µl	

Die Bedingungen für den Thermozykler waren bis auf die 'Annealing-Temperatur' bei allen 4 Primerpaaren identisch:

Tabelle 22: Thermozykler-Bedingungen

Zyklusphasen	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	95° C	5'	1
Denaturierung	95° C	30''	30
Annealing	Variabel	30''	
Synthese	72° C	30''	
	72° C	5'	1
Konservierung	4° C	∞	1

Tabelle 23: Annealingtemperaturen der einzelnen Primer

Primerpaar	Annealing-Temperatur
POMC 2 F/R	55° C
POMC 3a2 F/R	58° C
POMC 3b F/R	57° C

Tabelle 24: Durch PCR amplifizierte DNA-Fragmente

Primerpaar	Größe des Fragments	Funktion des Genabschnitts	Position im menschlichen POMC-Gen nach Takahashi
POMC 2 F/R	268 Bp	nicht kodierend	3731-3999
POMC 3a2 F/R	446 Bp	kodierend	6810-7256
POMC 3b F/R	550 Bp	kodierend	7221-7771

Trennung von Vor- und Nach-PCR-Bereich

Aufgrund der hohen **Sensitivität** der PCR-Methode bestand die Gefahr einer **Kontamination** durch DNA-Fragmente und PCR-Produkte. Deshalb erfolgte eine räumliche Trennung der Arbeitsbereiche:

Im Vor-PCR-Bereich fanden die **DNA-Extraktion** und das Ansetzen der Reaktionsgemische für die PCR statt. Zur Vermeidung von Verunreinigungen wurden die Reagenzien aliquotiert, und bei jeder Reaktion lief eine Wasserprobe als **Negativkontrolle** mit [Schimmel et al., 1996].

Im Nach-PCR-Bereich befanden sich die Thermozykler, in denen die DNA-Amplifikation stattfand, sowie Elektrophoresekammern und die Gerätschaften zur Durchführung der SSCA. Die Gerätschaften aus beiden Räumen dürfen nicht ausgetauscht werden.

2.6. Agarose-Gelelektrophorese

2.6.1. Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle sind aufgrund negativer Ladungen der Phosphatgruppe jedes Nukleotids insgesamt ebenfalls negativ geladen. Deshalb wandert die DNA im elektrischen Feld auf die Anode zu.

Die **Wanderungsgeschwindigkeit** hängt dabei von mehreren Faktoren ab:

1. **Molekülgröße:** Lineare doppelsträngige DNA wandert mit einer Geschwindigkeit durch die Gelmatrix, die umgekehrt proportional zum \log_{10} der Anzahl der Basenpaare ist [Helling et al., 1974]. Folglich wandern kleinere Fragmente schneller als größere, und so erfolgt eine Auftrennung der PCR-Fragmente entsprechend ihrer jeweiligen Länge.
2. **Agarosekonzentration:** Zudem ändert sich die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle mit der Agarosekonzentration des Gels: je höher die

Gelkonzentration, desto besser die Auftrennung der Fragmente.

Diese lineare Beziehung wird durch folgende Formel beschrieben:

$$\text{Log } \mu = \log \mu_0 - K_r \gamma$$

μ_0 = frei elektrophoretische Beweglichkeit der DNA

K_r = Verzögerungskoeffizient

3. **Angelegte Spannung:** Schließlich ist die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Fragmente auch noch proportional zur angelegten Spannung. Da die Gelmatrix eine zufällige Diffusion der Moleküle verringert, bilden sich konkrete Banden aus den PCR-Fragmenten.
4. **Tertiärstruktur der DNA**
5. **Interkalierender Farbstoff:** Die Einlagerung von Ethidiumbromid als Farbstoff in die DNA reduziert die Wanderungsgeschwindigkeit um bis zu 15 %.

Die Lokalisation der DNA-Fragmente im Agarose-Gel kann durch Färbung mit einer geringen Menge des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs **Ethidiumbromid** auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht und ausgewertet werden [Sharp et al., 1973]. Der Ethidiumbromid-Komplex absorbiert das **UV-Licht** bei 302 nm und reemittiert das Licht mit einer Wellenlänge von 590 nm, was dem Komplex ein orangerotes Aussehen verleiht.

Um die Größe der aufgetrennten PCR-Fragmente abschätzen zu können, läßt man immer einen Marker mit DNA-Fragmenten bekannter Größe mitlaufen.

Die Verwendung eines **Gel-Ladungs-Puffers** dient dazu, die Proben zu beschweren, damit die DNA in den Geltaschen bleibt und bei langer Beladedauer möglichst wenig DNA durch Diffusion verloren geht. Außerdem helfen die sichtbaren Bestandteile des Ladungspuffers beim Beladen und beim Abschätzen, wie weit die Proben im Gel schon gelaufen sind. Das enthaltene **Bromphenolblau** lief bei 2,5 % Agarose-Gelen ungefähr auf der Höhe von 100 Bp, das Xylenzyanolblau mit etwa der gleichen Laufgeschwindigkeit wie ein 460 Bp langes DNA-Fragment [Sambrook et al., 1989].

2.6.2. Vorbereitung und Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese

Zunächst wurden 5 g Agarose mit 200 ml 1 x TAE mehrmals aufgeköcht bis sich die Agarose gelöst hatte. Diese Lösung wurde nach Zugabe von 16 µl des Farbstoffs **Ethidiumbromid** und erneutem Mischen in einen mit Kämmen und Seitenabdichtungen vorbereiteten Schlitten gegossen. Durch die nach einigen Minuten erstarrende Agarose entstand eine **Matrix**, die in ihrer Dichte der Agarose-

Gelkonzentration von 2,5 % entsprach. Das auspolimerisierte Agarose-Gel wurde nach Entfernen der Kämme, in einer mit **Elektrophoresepuffer** (1x TAE s.Tab. 5) gefüllten Kammer liegend, beladen.

5-10 µl PCR-Produkt wurden dazu mit 5µl Ladungspuffer (Tab. 7a) vermischt und mit einer Mikropipette in die Geltaschen gefüllt. Als **Längenkontrolle** ließ man 1,2 µl einer Verdünnung des 123-bp-Markers mitlaufen. Durch diesen Marker, der neben den DNA-Proben auf dem Gel mitlief, konnte man die Größe, der in dem Gel vorhandenen Fragmente, abschätzen. Marker-Banden lagen bei 123, 246, 369, 492 615, 738, 861, 984, 1107, 1230, 1353, 1476, 1599, 1722, 1845, 1968, 2091, 2214, 2337, 2460. 2583, 2706, 2829, 2959, 3075, 3198, 3321, 3444, 3567, 3690, 3813, 3936, 4059 und bei 4182 Basenpaaren. Nach etwa 15' Laufzeit bei 200 V wurde das Gel auf dem UV-Schirm ausgewertet und zur Dokumentation mit Hilfe der **Polaroid-Video-Kamera** ein Photo davon angefertigt.

2.7. Digestion von DNA-Fragmenten

2.7.1. Allgemeines Verfahren der Digestion

Bakterielle **Restriktionsenzyme**, die man zur Digestion von DNA verwendet, dienen ursprünglich Prokaryonten dazu, organismusfremde DNA-Fragmente zu erkennen und zu zerschneiden, um die Bakterien vor Schäden durch fremdes Genmaterial (z.B. von Bakteriophagen) zu schützen.

In der Molekulargenetik macht man sich diese Methode in Kombination mit dem Wissen über die spezifischen **Erkennungssequenzen** und die Schnittstellen vieler Restriktionsenzyme zunutze. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen läßt sich sowohl eine Mutationsdetektion, bei bekanntem Mutationsort, durchführen (**Restriktionlängenpolymorphismus**) oder aber ein einfaches Zerschneiden der DNA-Fragmente in Stücke, deren Länge für bestimmte Methoden des Mutationsnachweises besser geeignet sind.

2.7.2. Spezielle Bedingungen der Digestion der POMC-Fragmente

Da die POMC-3a2/3b-PCR-Amplifikate mit 446 bzw. 550 Bp für einen möglichst sensitiven Mutationsscreen unter Anwendung der **'single-stranded-conformation-analysis'** (Erläuterung der Methode im nächsten Abschnitt) zu lang waren, mußte der Mutationssuche eine Digestion der beiden POMC-Fragmente vorausgehen. Dadurch gelangte man zu je zwei **DNA-Stücken** (insgesamt vier) mit

folgenden Längen:

POMC 3a2: 446 Bp → 205 Bp und 241 Bp

POMC 3B : 550 Bp → 332 Bp und 218 Bp.

2.7.2.1. Vorbereitung und Durchführung der Digestion

Zunächst wurde für jede PCR-Probe ein Reaktionsmix nach folgender Zusammensetzung vorbereitet:

Tabelle 25: Reaktionsmix für Digestion

Reagenzien	Menge/DNA-Ansatz
H ₂ O	11,8 µl
Puffer	3 µl
Spez. Enzym	0,2 µl
Summe	15 µl

Die 15µl Reaktionsmix wurden dann mit 15µl PCR-Produkt zusammenpipettiert und bei einer für das jeweilige Enzym spezifischen Temperatur für eine ebenfalls für das Enzym vorgegebene Mindestzeit im Wasserbad inkubiert.

Tabelle 26: Enzymeigenschaften der Digestionsenzyme

PCR-Fragment	Enzym	Temperaturoptimum	Puffer	Digestionsdauer
POMC 3a2	Eco 81 I	37° C	Yellow	Mind. 3 h
POMC 3b	Hin 1 I	37° C	Violett	Mind. 3 h

Nach Ablauf der Digestionsdauer wurde eine Erfolgskontrolle des Verdaus auf einem Agarose-Gel durchgeführt.

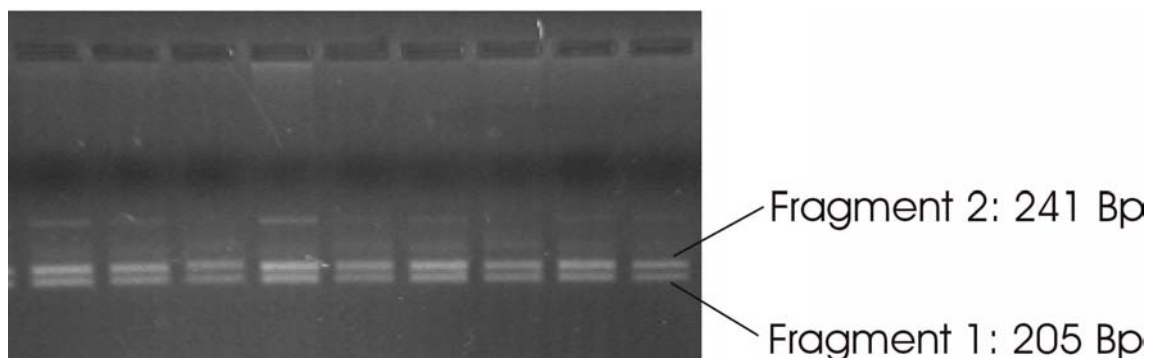


Abbildung 6: Agarose-Gel: Nachweis von Einzelfragmenten nach Digestion des POMC 3a2 Fragments

2.8. Single-strand-conformation-analysis (SSCA)

Grundsätzlich kann man die Methoden zum Mutationsnachweis in zwei Gruppen unterteilen:

- Techniken, die schon **bekannte Mutationen** sehr effizient nachweisen und somit vor allem im klinischen Bereich angewendet werden,
- Techniken, mit deren Hilfe man Genabschnitte auf noch **unbekannte Mutationen** durchscannen kann.

Obwohl es eine große Anzahl von verschiedenen Methoden zum Auffinden von Sequenzabweichungen den Wildtyp betreffend gibt, hat jede Methode in den jeweiligen Situationen ihre Vor- und Nachteile. Bis heute existiert noch kein Verfahren, das allen Anforderungen gleichzeitig gerecht wird.

Das Ausmaß von Mutationen erstreckt sich von zytogenetisch sichtbaren **Chromosomenveränderungen** über **Mikrodeletionen** und **Insertionen** bis hin zu **Punktmutationen**, bei denen nur eine einzelne Base ausgetauscht ist. Weiterhin ist es von Bedeutung, mit welchem Probenmaterial die Methode arbeitet; z.B. wird die m-RNA bestimmter Gene nur in bestimmten Zellen exprimiert und erschwert somit die Probengewinnung, da ein größerer und für die Gesundheit des Patienten riskanterer Eingriff von Nöten ist, um an die m-RNA zu gelangen. Hier zeigt sich der Vorteil von Verfahren, die direkt mit genomischer DNA arbeiten, da man diese aus Blut bzw. aus den **kernhaltigen Zellen** (Leukozyten, Lymphozyten etc.) relativ leicht extrahieren kann. Die SSCA gehört zu den Methoden, die mit DNA Proben arbeiten.

2.8.1. Allgemeines Verfahren der SSCA

Die Methode der SSCA wurde 1989 von Orita et al. zum ersten Mal beschrieben und hat sich seitdem zu der **weltweit gebräuchlichsten Technik** zum Screenen von Kandidatengen entwickelt.

2.8.1.1. Prinzip der SSCA zur Mutationssuche:

Die beiden Einzelstränge der jeweiligen Doppelstrang-DNA nehmen eine **dreidimensionale Struktur** ein, die auf der Primärstruktur des jeweiligen Einzelstranges beruht. Je nach dreidimensionaler Faltung wandern die Einzelstränge

unterschiedlich schnell entlang des **Spannungsgradienten** durch das Polyacrylamid-Gel. Alle DNA-Einzelstränge mit gleicher Basensequenz legen also in einer bestimmten Zeit eine bestimmte Wegstrecke im Gel zurück und werden somit in gleicher Höhe des Gels nach der Färbung sichtbar.

Ist nun die **Primärstruktur** eines Einzelstranges durch eine Insertion, eine Deletion oder den Austausch mehrerer oder sogar nur einer einzelnen Base verändert und damit verschieden vom Wildtyp, so ändert sich auch die **dreidimensionale Konformation** des Einzelstrangs und dessen Laufeigenschaften im Polyacrylamid-Gel.

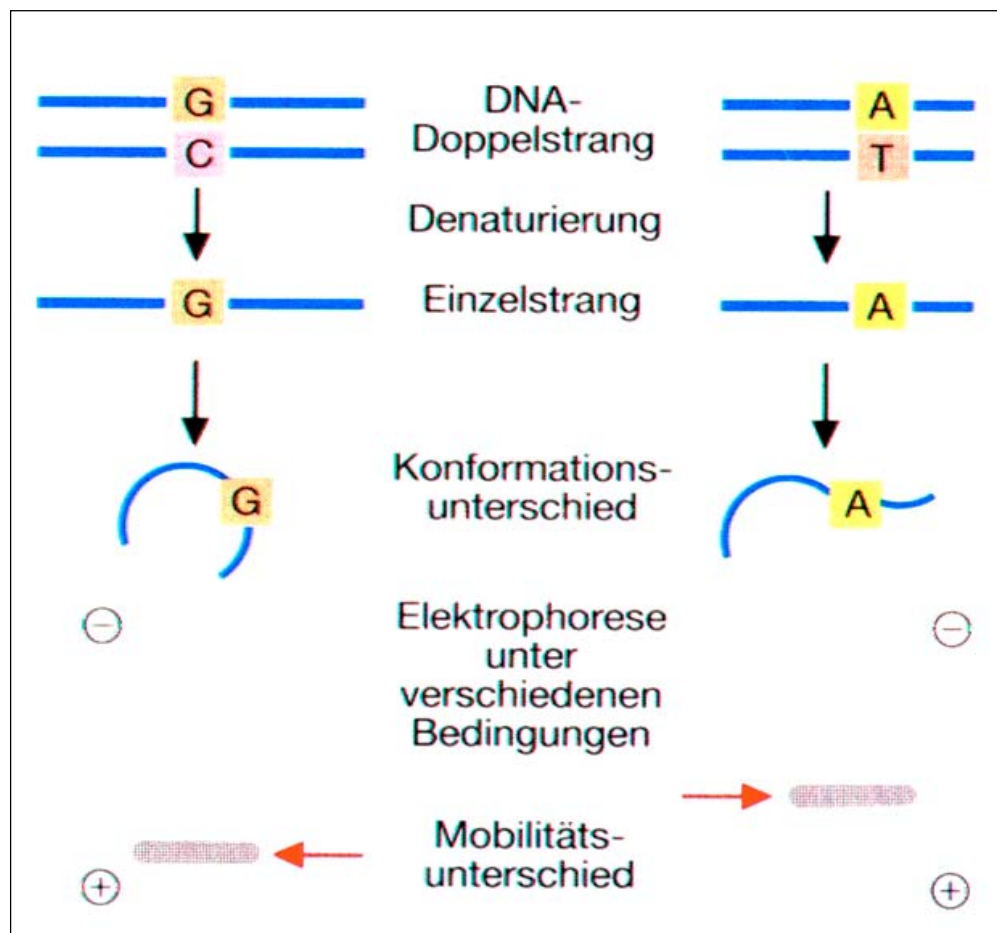


Abbildung 7: Prinzip der SSCA zur Mutationssuche

Abbildung modifiziert nach Molekulargenetik, Thieme

Als Resultat findet man nach dem **Anfärben** bei einer mutierten Probe ein **Bandenmuster**, das sich von dem des Wildtypen unterscheidet. Je nachdem, ob es sich beim Träger um eine **homozygot** oder eine **heterozygot** vorliegende Mutation handelt sind, entweder beide Banden (beide Allele) oder nur eine Bande (eins der beiden Allele) different zu den Wildtyp-Banden.



Abbildung 8: SSCA-Gel-Ausschnitt mit Wildtyp, Hetero-und Homozygoter Mutation

Photographische Darstellung von SSCA-Gel-Banden nach Silberfärbung und Trocknen

Die durch unterschiedliche Bandenmuster auffallenden Proben können dann mittels **DNA-Sequenzierung** analysiert werden, um die jeweilige Art der **Mutation** und die damit verbundene molekulargenetische und eventuelle klinische Relevanz festzustellen.

2.8.1.2. Methode

Zunächst wird der zu untersuchende Genabschnitt mittels PCR amplifiziert. Falls es aufgrund der **Fragmentlänge** notwendig ist, schließt sich wie im Fall des POMC-Gens eine enzymatische Digestion der Fragmente an. Die Proben werden zusammen mit einem SSCA-Ladungspuffer denaturiert und danach sofort auf Eis gelagert, um eine Renaturierung zu vermeiden. Der nächste Schritt beinhaltet das **Aufragen** der Proben auf ein Polyacrylamid-Gel und die anschließende **Elektrophorese** über einen bestimmten Zeitraum bei einer festgelegten Temperatur. Optimale Laufzeit und Temperatur werden zuvor in mehreren Optimierungsschritten für das jeweilige DNA-Fragment ermittelt. Die **Optimierung** wird für das POMC-Gen im speziellen in Abschnitt 7.2. erläutert. Nach Abschluß der Elektrophorese wird das SSCA-Gel mit Silber oder Ethidium-Bromid, gefärbt und anschließend getrocknet.

Als Alternative zur Silberfärbung gibt es auch die Möglichkeit die PCR-Produkte mit durch 32 Phosphor oder 35 Schwefel radioaktiv-markierten CTP's, die während der PCR an Stelle der sonst verwendeten nicht radioaktiven CTP's in das Produkt eingebaut werden, sichtbar zu machen. Die radioaktiven Anteile des PCR-Produkts sorgen dafür, daß man die Produkte unter Fluoreszenzlicht mit bloßem Auge erkennen kann und ersparen somit die Färbung

2.8.2. Vorbereitung und Durchführung der SSCA des POMC-Gens

2.8.2.1. Optimierung

Zur Optimierung der SSCA, die solange erfolgte, bis ein SSCA-Muster mit scharf begrenzten Banden zu sehen war, wurden zuerst die Acryl- und Bis-Konzentrationen (Verhältnis: 49:1) in folgender Weise variiert:

Tabelle 27: Gelzusammensetzungen zur Optimierung

Gel-Prozentigkeit	Acryl (40 %)-Menge	Bis (2 %)-Menge
8 %	6 ml	2,4 ml
10 %	7,5 ml	3 ml
12 %	9 ml	3,6 ml
15 %	11,25 ml	4,5 ml
20 %	15 ml	6 ml

Gleichzeitig mit der Prozentigkeit wurde auch die Umgebungstemperatur verändert. Jedes Gel lief bei **Raumtemperatur** und bei **4° C**.

Bei der Kombination aus Gel-Prozentigkeit und Temperatur, die die besten Ergebnisse lieferte, wurde das Verhältnis Acryl/Bis auf 99:1 verändert (9 ml Acryl (40 %), 1,8 ml Bis (2 %)). Anschließend änderte man, wiederum bei den Bedingungen mit den schärfsten Banden, den Zusatz: Statt 3 g Saccharose verwendete man 300 µl PEG 600 (Sigma) oder 3 ml Glycerol oder 300 µl PEG 600 und 1 ml Glycerol.

Die insgesamt besten Bedingungen wurden dokumentiert und unter ihnen der Genscreen bei allen Proben identisch durchgeführt.

2.8.2.2. Herstellung und Beladung von Polyacrylamid-Gelen

Nach der Optimierung stellten sich folgende Gelzusammensetzungen (Tabelle 28) für die einzelnen PCR-Fragmente als ideal heraus:

Tabelle 28: SSCA-Gelzusammensetzung für die einzelnen POMC Fragmente

Chemikalien	Menge pro 30 ml Ansatz		
	POMC 2	POMC 3a2	POMC 3b
Acryl (40 %)	9 ml	9 ml	9 ml
Bis (2 %)	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml
10 x TBE	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
PEG 600	- /(300 µl bei 4°)	300 µl	-
Bidest	15,9 ml (15,6 ml)	15,6 ml	15,9 ml
APS (10 %)	400 µl	400 µl	400 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl
Gelkonzentration	12 % ;49:1	12 % ;49:1	12 % ;49:1

Zum Gießen des Gels wurden die oben aufgeführten Chemikalien in einem 50 ml Falcon-Tube gemischt. Nachdem APS und TEMED, die Initiatoren der **Polymerisation** des Acryl-Bis-Gemischs, zu allerletzt hinzugefügt worden waren, mußte der Inhalt des Falcons schnell mit einer 20 ml-Spritze und einer Kanüle in die vorher nach Herstelleranleitung vorbereitete **Hoefler-Apparatur** gegossen werden, in der schon ein mit 10 %igem APS eingeriebener Kamm steckte. Die Glasplatten der Apparatur waren vorher mit Seifenwasser und Isopropanol gereinigt und schließlich mit Acrylease behandelt worden, um sie wasser- und gelabweisend zu machen. Dies erleichterte später das Lösen des Gels von den Platten.

Nach mindestens 2 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur war die **Auspolimerisation** des Gels abgeschlossen und es konnte beladen werden. Dazu mußten zunächst 3,5 µl PCR-Produkt, 3,5 µl A. dest. und 8 µl des SSCA-Gelladungspuffers zusammenpipettiert, bei 95° C für 5 ' denaturiert und sofort anschließend zur Verzögerung der Renaturierung der Einzelstränge auf Eis gestellt werden. Von jeder Probe wurden 7µl mit einer Mikroliterspritze in jeweils eine durch den Kamm entstandene Geldtasche appliziert.

Nach vollendetem Zusammenbau der Elektrophoresekammern und dem Anschluß an eine Spannungsquelle lief das Gel dann über Nacht (ca. 18 h) entweder bei Raumtemperatur und 150 V oder bei 4° C und 200 V. Als Laufpuffer diente dabei 0,5 x TBE.

2.8.3. Färbung und Trocknen der SSCA-Gele

Am nächsten Morgen wurde das Gel aus der Apparatur entfernt und auf folgende Art und Weise gefärbt [modifiziert nach Budowle et al., 1991]:

- Mit 500 ml einer wässrigen Lösung, die **10 % Ethanol** und **0,5 % Eisessig** enthielt, wurde das Gel von der Glasplatte gelöst (etwa 5') und die DNA im Gel fixiert.
- Zum **Oxidieren** schwenkte man das Gel danach für 10' in 250 ml einer 1 %igen Salpetersäurelösung und spülte im Anschluß kurz mit Bidest nach.
- Zur **Färbung** ließ man das Gel für 20-30' in 250 ml einer 12 mM AgNO₃-Lösung inkubieren, damit sich die positiv geladenen Silberionen an die DNA anlagern konnten. Die Silbernitrat-Lösung wurde nach Gebrauch in einem Behälter aufgefangen und konnte somit mehrmals benutzt werden. Es schloß sich ein weiterer Spülschritt mit Bidest an.
- Zur **Reduktion** behandelte man das Gel mit einer 280 mM NaCO₃ Lösung, die 0,019 % Formaldehyd enthielt. Nach zweimaligem Austauschen der Lösung ließ man das Gel dann so lange im NaCO₃ liegen, bis die nun sichtbar werdenden Banden die gewünschte Intensität und Schärfe erreicht hatten.
-
- Mit 250 ml einer 10 % Eisessig-Lösung wurde die Reduktion gestoppt (Dauer: etwa 5 Minuten).
- Zur **Konservierung** legte man das Gel zum Abschluß in ein Gemisch aus Bidest und Glycerol.

Die gefärbten Gele konnten zur Aufbewahrung auf Filterpapier gelegt und mit Hilfe der **Vakuum-Drehschieberpumpe** für 2-3 Stunden vakuumgetrocknet werden.

2.9. Sequenzierung

2.9.1. Allgemeines Verfahren der Sequenzierung

Während man in der Vergangenheit für die Sequenzierung von DNA-Fragmenten meist chemische Verfahren verwendete, bedient man sich heutzutage vor allem einer **enzymatischen Methode**, die schematisch in Abbildung 9 dargestellt ist.

Die DNA liegt nach einer **Denaturierung** als Einzelstrang vor. Diese einzelsträngige Matrize dient als Vorlage für einen neuen komplementären DNA-Strang, der von einer **DNA-Polymerase** synthetisiert wird. Das Reaktionsmix enthält zusätzlich zu den vier normalen Nukleotid-Bausteinen (Guanin, Adenin, Thymin, Cytosin) jeweils noch eine Sorte Didesoxynucleotide (ddNTPs). Diese ddNTPs sind Analoga zu den normalen Nukleotid-Bausteinen (dNTPs) unterscheiden sich aber am 3'-Kohlenstoff, in dem ihnen dort im Gegensatz zu den dNTPs eine Hydroxylgruppe fehlt.

Durch diesen Unterschied kann ein Didesoxynukleotid zwar eine Phosphordiesterbindung am 5'-Kohlenstoffatom mit der vorher eingebauten Base ausbilden, es ist aber nicht in der Lage, an seinem 3'-Kohlenstoffatom den folgenden

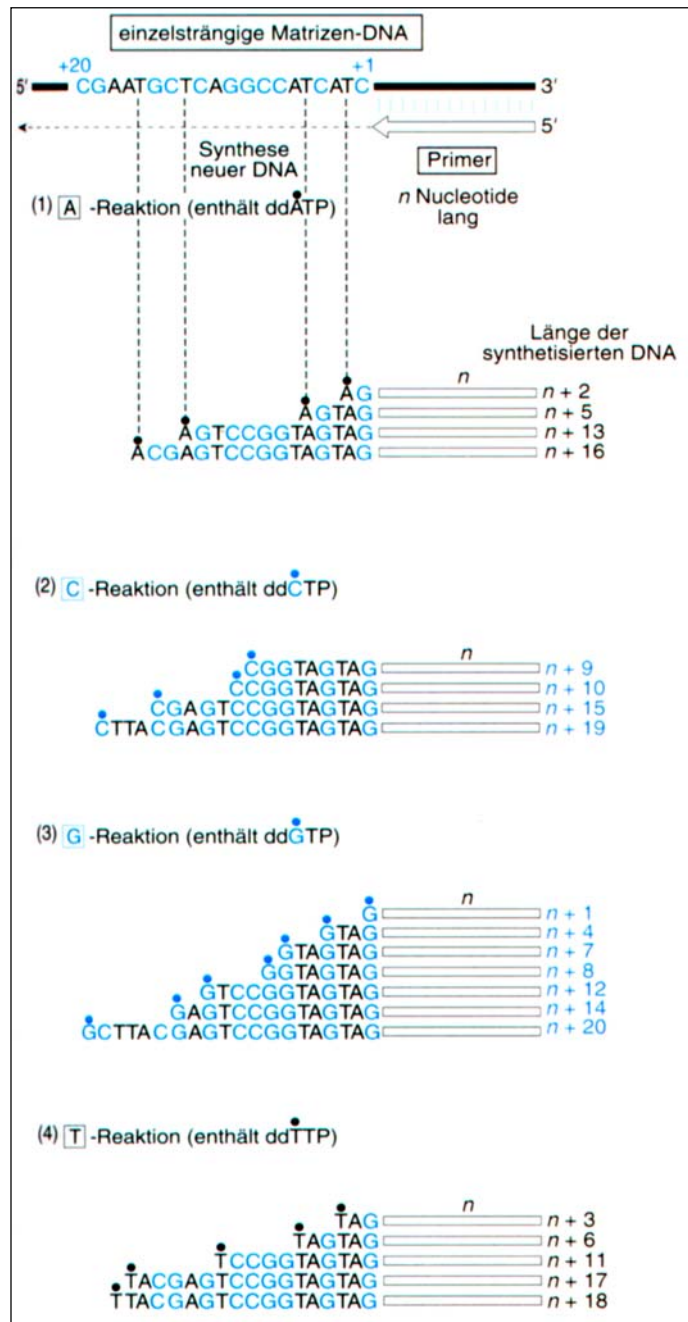


Abbildung 9: Schema der Sequenzreaktion eines DNA-Fragmentes

Abbildung modifiziert nach Strachan et al., 1996

Nukleotid-Baustein zu binden, da für eine Phosphordiesterbindung dort die benötigte Hydroxylgruppe fehlt. Somit kann nach dem Einbau eines ddNTPs in die DNA-Kette

diese nicht weiter verlängert werden, und die Synthese wird abgebrochen.

Bei der **Sequenzreaktion** führt man parallel vier basenspezifische Reaktionen in einem Thermocycler durch. Jede Reaktion enthält das zu sequenzierende DNA-Stück, einen komplementären Sequenzprimer (Dieser markiert den Beginn des zu sequenzierenden Bereichs), die **vier dNTPs** (Guanin, Adenin, Thymin, Cytosin) und jeweils eine geringe Menge von einem der **vier ddNTPs** (ddGTP, ddATP, ddTTP oder ddCTP). Da die Konzentration des jeweiligen ddNTP-Analogons wesentlich geringer als die des zugehörigen normalen dNTPs, kommt es in statistischer Verteilung an einer der vielen Positionen, an denen das entsprechende Nukleotid in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird, zu einem **Syntheseabbruch**. Dies bezeichnet man als partielle Reaktion.

Es entstehen so in jedem der vier Reaktionsgemische DNA-Fragmente, die alle ein identisches 5'-Ende, das dem Sequenzprimer entspricht, aber eine unterschiedliche Länge aufweisen. Das 3'-Ende der **verschieden langen Fragmente** trägt das ddNTP, welches in dem Reaktionsansatz jeweils vorhanden ist.

Die sich in ihrer Länge teilweise nur durch ein einziges Nukleotid unterscheidenden Fragmente lassen sich in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel mittels Elektrophorese auftrennen (Vgl. Abbildung 9). Hierzu gibt man eine bestimmte Menge der **vier Reaktionsprodukte** in jeweils eine Tasche des Sequenzgels und dokumentiert die Reihenfolge z.B.: A, C, G, T. Durch das aufgrund der Länge

unterschiedlich hohe **Molekulargewicht** wandern die Fragmente verschieden schnell durch das Gel. In jeder Laufhöhe der vier Spuren sollte somit bei der Auswertung der DNA eines homozygoten Trägers nur ein Fragment, das entweder A, C, G oder T entspricht vorhanden sein.

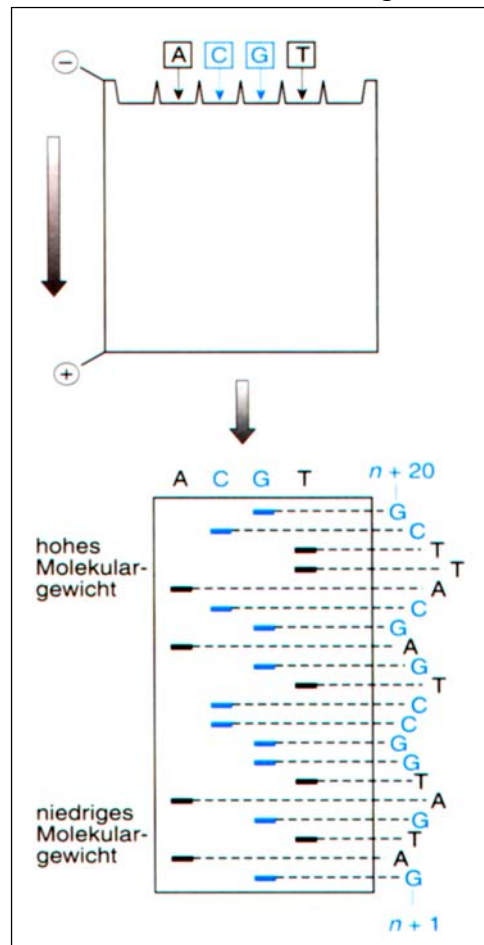


Abbildung 10: Schema einer Gelelektrophorese zur Sequenzierung

Abbildung modifiziert nach Strachan et al., 1996

Um die sich im Gel auftrennenden Fragmente sichtbar zu machen, sind die Nukleotide entweder durch ³⁵S oder ³³P radioaktiv markiert, oder man verwendet **fluoreszenz-markierte Primer**, die mittels eines automatischen Sequenzers detektiert werden können [Strachan et al.,1996].

2.9.2. Vorbereitung der Proben zur Sequenzierung

2.9.2.1. PCR

Zur Amplifizierung der zu sequenzierenden Proben wurde zuerst eine PCR vom jeweiligen Genfragment mit den gleichen Mengen der einzelnen Reagenzien und den selben Bedingungen, wie unter Punkt 5.2.3. (Tabellen: 18, 19, 20) beschrieben, durchgeführt. Die Erfolgskontrolle der PCR fand ebenso durch Agarose-Gelelektrophorese statt.

2.9.2.2. Aufreinigung durch Extraktion aus low-melting Agarose

5µl der unter 9.2.1. gewonnenen PCR-Amplifikate wurden mit 5µl Laufpuffer gemischt auf ein 'low-melting' Agarose-Gel aufgetragen und eine Elektrophorese von 1-2 Stunden Dauer bei 50 Volt durchgeführt.

Die **Herstellung** des low-melting Agarose-Gels entsprach der der herkömmlichen Agarose-Gele (siehe Punkt 6). Der Unterschied des low-melting Gels bestand darin, daß es die Eigenschaft hatte bei einer Temperatur unter 65° C zu schmelzen und somit während eines PCR-Zyklus in flüssiger Form vorlag. Die in der Gelmatrix enthaltene DNA wurde dadurch freigesetzt und war der Polymerase für die Vervielfältigung frei zugänglich.

Nach **Beendigung der Elektrophoresedauer** waren die PCR-Fragmente bis zu 5 cm durch das Gel gewandert, und alle unspezifischen PCR-Produkte, die in der Länge vom gewünschten Amplifikat differierten, hatten entweder eine längere oder kürzere Wegstrecke durch das Gel zurückgelegt. Mit autoklavierten Pipetten-Spitzen wurde nun ein Teil der **spezifischen Banden** aus dem Gel extrahiert. Zu dem gewonnenen Material wurde jeweils ein 100µl Reaktionsmix-Ansatz (vierfacher Ansatz des PCR-Ansatz unter Punkt 5.2.3.) hinzupipettiert und die PCR unter den fragmentspezifischen Bedingungen durchgeführt. Aus jeder Bande wurden zwei Proben gewonnen und PCR-Gemische angesetzt, damit für den folgenden Schritt der Quia-Quix-Aufreinigung eine ausreichende Menge DNA zur Verfügung stand.

2.9.2.3. Aufreinigung mittels Quia-Quick

Die aus low-melting gewonnene und mittels PCR amplifizierte DNA wurde im nächsten Reinigungsschritt durch das **Quia-Quick-Prinzip** (nach dem Quia-Quick PCR Purifikation Kit Protokoll des Herstellers) von Kontaminationen befreit.

Das Prinzip der Quia-Quick Reinigung beruhte auf der selektiven Bindung von DNA an einer in Mikrotubes eingebauten **Silica-Gel-Membran**. Während diese Membran die DNA bindet, wurden andere Stoffe, die neben dem eigentlich interessanten Genfragment in der Probe vorhanden waren, nicht gebunden und konnten so verworfen werden. Um die Proben zu filtrieren, nutzte man eine Mikrozentrifuge und verschiedene Puffer.

Das Prozedere nach Angaben aus der Herstelleranleitung:

1. 500µl des **PB-Puffers** wurden zu 100µl Probe hinzugegeben.
2. Dieses Gemisch wurde in ein **Quia-Quick spin column** pipettiert, das man vorher in ein 2 ml fassendes Auffangtube gestellt hatte.
3. Um eine **Bindung der DNA an der Silica-Membran** zu erreichen, zentrifugierte man diese ineinandergesteckten Tubes 30-60 sek bei 13000 rpm in der Mikrozentrifuge. Nach Verwerfen der sich im Auffangtube befindenden Flüssigkeit wiederholte man diesen Schritt mit den zweiten 100µl derselben Probe und benutzte dabei das gleiche spin-column. Durch die Doppelbeladung erreichte man eine höhere DNA-Konzentration des Endprodukts.
4. Im **Waschschritt** belud man das spin column mit 0,75 ml PE-Puffer und zentrifugierte erneut wie oben beschrieben. Nach Entleerung des Auffangtubes schloß sich eine weitere einminütige Zentrifugation an.
5. Zum **Herauslösen** der DNA aus der Silica-Filter-Membran platzierte man das spin column in ein frisches 1,5 ml Tube, applizierte 50µl EB Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) auf das Zentrum des Quia-Quick-columns und zentrifugierte nach einminütiger Standzeit für 1 Minute. Man erhielt als Endprodukt ca. 48µl gereinigte Probe.

2.9.2.4. Fällung

Als Ergänzung zu den unter Punkt 9.2.2. und 9.2.3. erläuterten **Aufreinigungsverfahren** konnte man zur weiteren Erhöhung der Reinheit der PCR-Produkte, die als Matrizen für die Sequenzierung dienen sollten, zwei unterschiedliche Verfahren der Fällung benutzen:

- a) **Natriumacetat-Fällung:** Diese Methode der Fällung wurde bei besonders unspezifischen PCR-Produkten angewendet und ging dem Schritt der Aufreinigung mittels low-melting Agarose voraus. Hierzu benötigte man 400 µl PCR-Reaktionsprodukt, welches mit 2,5-fachen Volumen Ethanol absolut (1ml) und 1/10 des Gesamtvolumens an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) (140 µl) für 10' bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit (1300 rpm) zentrifugiert wurde. Nach **Dekantierung** des Überstandes wurde die Probe mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, danach wiederum 15' bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Diesmal wurde der Überstand ganz vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und die verbliebene DNA 10-15' an der Luft getrocknet. Anschließend mußte die DNA in 20 µl A. dest. resuspendiert und wie in Punkt 9.2.2. beschrieben auf low-melting Agarose aufgetragen und extrahiert werden.
- c) **Ammoniumacetat-Fällung:** Wenn die PCR spezifische Produkte lieferte, wurde die DNA mit 7,5 M Ammoniumacetat gefällt. Dazu mußten zunächst 200 µl PCR-Produkt mit 235 µl Ammoniumacetat (7,5 M) und 500 µl Ethanol abs. gemischt und 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert werden. Der Überstand konnte dann abgesaugt und das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol, wie oben beschrieben, gewaschen werden. Nach vorsichtiger Entfernung des Überstands ließ man die DNA für einige Minuten an der Luft trocknen und löste dann die getrocknete DNA in 30 µl Bidest.

Nach beiden Arten der Fällung bestimmte man die **Konzentration** der DNA, indem man 5 µl der neu gelösten DNA mit 4 µl Agarose-Gelladungspuffer auf ein Agarose-Gel auftrug, auf dem man 2 µl der Verdünnung des '**low-DNA-mass-ladders**' (200 µl mit je 100 µl Agarose-Gelladungspuffer und A. dest.) mitlaufen ließ. Die Bande des low-DNA-Mass-Ladders, die von der **visuellen Intensität** mit der Bande der Probe äquivalent war, entsprach von ihrer Masse-Eigenschaft, der der Probe. Anhand der Masse-Informationen des '**low-DNA-mass-ladders**' war auch die Masse an DNA in der Probe bekannt und wieviel µl der Probe man einsetzen mußte um die, für die Sequenzreaktion benötigten **75ng DNA** zu erreichen (siehe Tabelle 28).

2.9.3. Sequenzierung des POMC-Gens

Nachdem man durch die verschiedenen Reinigungsschritte ein möglichst reines

DNA-Template zur Sequenzierung erhalten hatte, wurden pro Probe, die sequenziert werden sollte, ein Reaktionsmix nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 29: Reaktionsmix für Sequenzreaktion der POMC-Fragmente

Reagenzien	Menge
75 ng DNA	X µl *
1-2 pmol Primer	2 µl **
DMSO	0,7 µl
Aqua dest	Auf 12µl auffüllen

* Die Menge der einzusetzenden DNA in µl richtete sich nach der Intensität der DNA-Bande im Agarose-Gel, die optisch mit der Intensität der einzelnen 'low-DNA-mass-ladder' Banden verglichen wurde und so eine Gewichtsabschätzung der Proben DNA zuließ.

** Für Forward und Reverse Sequenzierung wurden getrennte Ansätze vorbereitet. Zu jedem Reaktionsmix wurde einer der fluoreszenzmarkierten Primer (POMC 3a2 F 700, POMC 3a2 R 800, POMC 3b F 700, POMC 3b R 800) pipettiert.

Jeweils 2,5 µl des Reaktionsmixes teilte man auf vier Tubes auf und gab 1 µl G, A, T oder C des „**Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP**“ von Amersham hinzu. Danach mußten die Proben vor Lichteinfall geschützt werden, da die Fluoreszenz-Farbstoffe sehr sensitiv auf Licht reagieren. Die Sequenzreaktion fand in einem Thermocycler der Firma Perkin Elmer bei folgenden Bedingungen statt:

Tabelle 30: Thermocycler Bedingungen für die Sequenzierung der POMC Fragmente

Zyklusdauer	Temperatur	
	POMC 3a2 F700 oder R800	POMC 3b F700 oder R800
3 Minuten	94° C	94°C
30 Sekunden	94° C	94° C
30 Sekunden	58° C	57 ° C
30 Sekunden	70° C	70° C
3 Minuten	72 °C	72 °C
Zykluszahl	25	25

Nach Beendigung der Sequenzreaktion wurde diese durch die Zugabe von 2,5 µl „**Formamid loading dye**“ aus dem Amersham Sequenz Kit gestoppt. Die Proben wurden in Aluminiumfolie gewickelt und bei 4° C gelagert bis sie zum Auftragen auf das Sequenzgel wieder benötigt wurden.

2.9.4. Der Licor-Sequenzier

2.9.4.1. Herstellung und Vorbereitung des Sequenzgels

Zum Gießen des Sequenzgels wurden zunächst folgende Chemikalien in einem 50 ml Falcon–Tube gegeben und ausgiebig gemischt:

Tabelle 31: Zusammensetzung des Sequenzgels

Reagenzien	Menge
Long Ranger	4,5 ml
Urea (Harnstoff)	15,75 g
10x TBE	3,75 ml
HPLC Wasser	Auffüllen auf 37 ml
Konzentration des Gels	6 %

Nach Filtration des Gemischs und Zugabe der Polymerisationsinitiatoren (37 μ l TEMED und 260 μ l APS (10 %)) konnte das Gel in die vorbereitete Apparatur gegossen werden.

Diese **Apparatur** bestand aus zwei 41 cm langen Glasplatten, die durch zwei Abstandhalter derselben Länge in einer Entfernung von 0,25 mm aufeinanderlagen und mittels zweier seitlicher Schraubzwingen fixiert wurden. Durch die **Kapillarkräfte** angetrieben lief das zwischen die beiden Platten gegossene Gel-Gemisch solange in den Freiraum zwischen beiden Platten und Abstandhalter, bis dieser vollständig von Gel-Gemisch ausgefüllt war. Mit Blasenfängern unterschiedlicher Länge ließen sich Luftblasen, die beim Gießen entstanden waren, aus dem noch nicht auspolimerisierten Gel entfernen.

Am oberen Rand der beiden Glasplatten wurde ein **Vorkamm** zwischen die Platten eingeführt. Dieser Vorkamm bildete später im auspolimerisierten Gel eine ca. 15 cm lange und 0,5 cm tiefe Geltasche, in die der sogenannte Haifischkamm geschoben werden konnte. Nach einer **Auspolimerisierungszeit** von 2-3 Stunden wurde die Gelapparatur, insbesondere die Glasplatten, von außen gereinigt und nach Entfernen des Vorkamms und Montage des oberen Puffertanks in den Li-Cor-Sequenzier eingesetzt.

Nach **Säuberung** der durch den Vorkamm ausgesparten Geltasche mittels einer 50ml Spritze, gefüllt mit 1x TBE, steckte man einen Haifischkamm in den ausgesparten Bereich, der dadurch in 48 Kompartimente geteilt wurde. Der obere und untere Puffertank mußten mit 1x TBE als Laufpuffer gefüllt werden und die Pufferkammerabdeckungen mit dem Sequenzier verbunden werden, um diesen endgültig für Vorlauf und Sequenzlauf einsatzbereit zu machen.

2.9.4.2. Einstellung der Software und Durchführung der Sequenzierung

Nachdem der Sequenzer in Punkt 9.4.1. hinsichtlich der Hardwareseite für die Sequenzierung vorbereitet worden war, wurden die **Software-Einstellungen** vorgenommen. Dazu diente das Programm '**Data-Collection**', ein Unterprogramm der '**BaseImageR-Software**'. Mit Hilfe des Befehls '**Auto-Gain**' wurden Unregelmäßigkeiten im Gel auf Softwareebene ausgeglichen und durch die Fokussierung die Meßeinheit des Sequenzers justiert. Anschließend startete man einen mindestens 30 Minuten dauernden Vorlauf, durch den das Sequenzgel von Verunreinigungen befreit wurde. Der Vorlauf wurde mit den selben Einstellungen wie die spätere Sequenzierung durchgeführt (Tabelle 30).

Während des **Vorlaufs** hatte man die Möglichkeit, bei, eventuell durch Verschmutzung verursachter, herabgesetzter Bildqualität die Position der Gelapparatur in einem vorgegebenen Maß zu verändern, um so die Qualität der Datenmessung zu verbessern.

Nach Beendigung des Vorlaufs konnten die Proben in die durch den Haifischkamm begrenzten Taschen gefüllt werden. Dabei applizierte man in der Reihenfolge Guanin, Adenin, Thymin, Cytosin jeweils 1µl Probe in jede Tasche. Für jede zu analysierende DNA-Sequenz benötigte man somit 4 Taschen.

Möglichst schnell nach Beladung des Gels wurde die Sequenzanalyse mit folgenden Parametern, die man auch für den Vorlauf verwendete, gestartet:

Tabelle 32: Li-cor Einstellungen zur Sequenzierung

Parameter	Einstellung
Spannung	1500 Volt
Stromstärke	37 mAmpere
Power	40 Watt
Heater	50° Celsius
Scan speed	3

2.9.4.3. Auswertung und Datensicherung

Nach 8-10 Stunden waren die Daten für die Sequenzanalyse vom Sequenzer gesammelt worden und konnten mit dem Programm '**Data-Analysis**', Bestandteil der '**Base ImageR Software**', ausgewertet werden. Hier gab es die Möglichkeit, eine DNA-Sequenz, bestehend aus vier Lanes (G, A, T, C), vom Computer automatisch

analysieren zu lassen und zur Kontrolle dieses Ergebnis anhand des gespeicherten Gel-Bilds nachzuvollziehen. Damit der Computer die **automatische Analyse** durchführen konnte, mußte man zunächst definieren, in welcher Lane welche Base zu erwarten war. Mit der 'Band-spacing Funktion' legte man den Abstand zwischen zwei Basen fest. Nachdem man die Startbase festgelegt hatte, detektierte der Computer von dieser Base an die Sequenz so lange, bis entweder das Ende des Template erreicht war, die schlechte Qualität kein Fortsetzen des Detektierens zuließ oder der Benutzer die Detektion stoppte. Die ermittelte Sequenz wurde als '**SCF-File**' ausgedruckt und auf CD-Rom mittels eines CD-Brenners gesichert.

Die Auswertungen sowohl der SSCA-Gele als auch der Sequenzierungen wurde jeweils von **zwei Personen** durchgeführt. Während bei den SSCA-Gelen die beiden Personen unabhängig voneinander die Banden der Gele befundeten, wurde bei den Sequenzierungen gegengelesen, d.h. eine Person las die von der Licor-Sequencer-Software detektierte Basensequenz vor und überprüfte dabei, ob die Software die stärkste Bande erfaßt hatte, während die andere Person dies mit der Originalsequenz, die von Takahashi veröffentlicht wurde, verglich. Dadurch werden sowohl **systematische Fehler** (z.B. durch die Computersoftware) als auch **zufällige Fehler** (ein einzelner Auswerter kommt beim Vergleichen durcheinander) vermieden. Nachdem die Ergebnisse der SSCA nach der ersten Auswertung in den Computer eingegeben und ausgedruckt worden waren, wurde dieser Ausdruck erneut durch zwei Personen kontrolliert. Bei fraglichen Auswertungen wurde eine qualifizierte dritte Person zu Rate gezogen, um das Ergebnis zu objektivieren

2.10. Statistische Methoden

2.10.1. Durchführung eines statistischen Test

Die statistischen Berechnungen wurden im Institut für Biometrie der Philipps Universität Marburg von PD Dr. A. Ziegler durchgeführt.

Die Durchführung eines statistischen Test umfaßte die folgenden Schritte: [nach Sachs, 1979]

Assoziations Studie:

1. Formulierung der Hypothese und Formulierung der Verteilungsannahmen:

Es wurde eine **Nullhypothese** ($H_0: p_1 = p_2$) und eine zweiseitige **Alternativhypothese** ($H_1: p_1 \neq p_2$) aufgestellt. Da explorative Untersuchungen durchgeführt wurden, war kein Vorwissen bezüglich der Allelverteilung, des genetischen Modells, etc. vorhanden. Infolgedessen wurde die Alternativhypothese zweiseitig formuliert, da kein Wissen über die Fehlerrichtung der Häufigkeitsschätzer $\hat{p}_{1,2}$ bestand ($\hat{p}_1 < \hat{p}_2$ oder $\hat{p}_1 > \hat{p}_2$).

2. Wahl der Stichproben:

Es wurde entschieden, welche Stichproben der verschiedenen Phänotypen zum Einsatz kommen, und ob einzelne Probanden oder Kernfamilien untersucht werden.

3. Wahl der Teststatistik:

Die Teststatistiken wurden mittels χ^2 -Test bei einem Freiheitsgrad durchgeführt (Vierfeldertafeln, vgl. Tab. 31). Diese Vierfeldertafeln haben einen Freiheitsgrad; bei gegebenen Randsummen kann nur ein Feld frei gewählt werden.

4. Wahl der Irrtumswahrscheinlichkeit α (Signifikanzniveau) und kritischer χ^2 -Wert:

Das Signifikanzniveau wurde immer mit $\alpha = 0,05$ vorgegeben. Die kritische Grenze des χ^2 - Wertes bei einem Freiheitsgrad und dieser Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 3,84.

5. Durchführung der Teststatistiken und Interpretation der Ergebnisse:

Es wurde geprüft, ob eine ‚wahre‘ Assoziation vorhanden war oder die Nullhypothese gilt. Auch wurde für multiples Testen korrigiert. **χ^2 - Wert > 3,84** sprachen gegen die Nullhypothese und führten zu ihrer Verwerfung. Der dem berechneten χ^2 - Wert (mit einem Freiheitsgrad) zugehörige P-Wert wurde aus Tabellen abgelesen. Ein **P-Wert < 0,05** wurde als signifikant angegeben. Er gibt die Wahrscheinlichkeit eines Irrtums an.

2.10.2. Teststatistiken

χ^2 -Tests vergleichen Stichproben aus Binominalverteilungen oder prüfen die Unabhängigkeit zweier Merkmale, die beide durch alternative Merkmalsausprägungen gekennzeichnet sind.

Geprüft wurden die Hypothesen:

H_0 = Die Verteilung der Allele ist **unabhängig** vom Phänotyp.

H_1 = Die Verteilung der Allele ist **abhängig** vom Phänotyp (Assoziation).

In eine Vierfeldertafel (siehe Tab. 33) wurden die festgestellten Häufigkeiten der Allele für die Stichproben eingetragen und der entsprechende χ^2 -Test durchgeführt.

		Merkmal 1		
		Allel A ₁	Allel A ₂	Zeilen- summen
Merkmal 2 (Gewicht)	Patienten	a	b	$a + b = n_1$
	Kontrollen	c	d	$c + d = n_2$
	Spaltensumme	$a + c$	$b + d$	$n_1 + n_2 = n$
		Erwartungs- häufigkeit		
				$\frac{a}{n_1} = \hat{p}_1$
				$\frac{c}{n_2} = \hat{p}_2$

Tabelle 33: Schema einer Vierfeldertafel beim χ^2 - Test
n: Gesamtheit der Stichproben

2.10.2.1. Chi-Square-Test nach Pearson

In der Regel wurde der χ^2 -(Chi-Square)-Test nach Pearson verwendet.

$$\chi^2\text{- Test nach Pearson: } \chi^2 = \frac{n(ad - bc)^2}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

2.10.2.2. Der exakte Test nach Fisher

Neben χ^2 -Test nach Pearson wurde auch mit dem exakten Test nach Fisher gerechnet. Bei Vierfeldertafeln mit einer sehr kleinen Stichprobe n geht man vom Feld mit der geringsten Häufigkeit aus und stellt unter Konstanz der Randsummen alle Vierfeldertafeln auf, die in dem betreffenden Feld noch schwächer besetzt sind. In der Gesamtheit aller dieser Vierfeldertafeln haben diejenigen mit der beobachteten oder einer noch geringeren Besetzung des am schwächsten besetzten Feldes die Wahrscheinlichkeit P als eine Summe von Gliedern der hypergeometrischen Verteilung:

$$P = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!} \sum_i \frac{1}{a_i!b_i!c_i!d_i!}$$

Der Index i bedeutet, daß für jede der aufgestellten Tafeln der hinter dem Summenzeichen stehende Ausdruck zu berechnen und dann in der Summe zusammenzufassen ist. Die Wahrscheinlichkeiten können direkt aus Signifikanztafeln abgelesen werden. [Sachs 1979; 5. 288 ff]. Dieser Test wurde angewandt, wenn eine der Erwartungshäufigkeiten <5 und/oder $n < 20$ war.

2.10.2.3. Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium setzt eine ausreichend große Population voraus. Die möglichen Paarungstypen entsprechen dabei der **Häufigkeit der Allele** und einer zufälligen Paarung (Panmixie). Das Äquilibrium beschreibt eine konstante Allelhäufigkeit. Durch z. B. schwere Krankheiten ausscheidende homozygote Individuen mit den ausscheidenden Allelen aa werden durch neue Mutationen ersetzt. Zwischen dem Ausscheiden der Allele und der Mutationshäufigkeit besteht ein **Gleichgewicht**. Eine Änderung der Mutationshäufigkeit ist von einer Änderung der Allelfrequenz begleitet.

Die **Hardy-Weinberg-Formel** lautet: $1 = p^2 + 2pq + q^2$

p : Allelhäufigkeit des Allels A_1 und q : Allelhäufigkeit des Allels A_2

Mit dieser Formel ließen sich die Häufigkeiten der drei Genotypen in einer Population mit Hilfe der experimentell bestimmten Allelfrequenzen berechnen. Die berechneten **Genotypfrequenzen** sollten, mit den experimentell gefundenen übereinstimmen. Keine Übereinstimmung sollte den Hinweis auf **grobe systematische Fehler** geben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Überblick aller Ergebnisse

Mittels SSCA fanden sich die in Tabelle 34 aufgeführten Mutationen im POMC-Gen.

Es wurden acht verschiedene Varianten gefunden und durch Sequenzierung identifiziert: Eine **9-Basenpaar-Insertion** sowie eine **18-Basenpaar-Insertion** im Bereich des 16-K Fragments, eine **6-Basenpaar-Insertion** im für das γ -Lipotropin kodierenden Bereich, eine **Missense- und eine Nonsense-Variante** im für das γ -Lipotropin kodierenden Bereich, von denen eine zu einem Kettenabbruch führt und fünf Basenpaar-Austausche, bei denen sich die ursprüngliche Aminosäuresequenz nicht ändert. Die Positionen der Varianten innerhalb des POMC-Gens sind in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

Die Varianten traten bei sechs verschiedenen Patienten auf. Drei Patienten wiesen dabei mehr als eine Variante auf. Sämtliche Varianten wurden in **Exon 3** (Fragmente 3a bzw. 3a2 und 3b) gefunden. Die von Krude et al. identifizierten Mutationen im **Exon 2** des POMC-Gens fanden sich im Kollektiv dieser Arbeit nicht [Krude et al., 1998].

In Abschnitt 3.2 werden die Varianten im einzelnen graphisch dargestellt und detailliertere Angaben zu den Variantenträgern gemacht.

Zur **Nummerierung** des POMC-Gens diente die Veröffentlichung der Sequenz nach Takahashi, die auch von Krude et al. verwendet wurde [Takahashi et al., 1983; Krude et al., 1998].

3.1.1. Tabellarische und graphische Darstellung der Mutationen

	Basenposition***	Aminosäuren- Veränderung	Gen-Abschnitt im POMC-Gen*	PCR- Fragment	Allel- Frequenz
Patient 1	Zwischen Position 6997 und 6998	Insertion von Ser- Ser-Cys	16 K Fragment	3 A2	0.052
Patient 2	Zwischen Position 6997 und 6998	Insertion von Ser- Ser-Cys Ser-Ser-Cys	16 K Fragment	3 A2	<0.01
Patient 3	Zwischen Position 7304 und 7305	Insertion von Arg- Ala	γ -LPH	3 B	<0.01
Patient 3	G-7316-T	Glu-206-Stop	γ -LPH	3 B	<0.01
Patient 3	A-7341-G	Glu-214-Gly	γ -LPH	3 B	<0.01
Patient 4/1**	C-6982-T	Stummer Austausch	16 K Fragment	3 A2	<0.01
Patient 5/1**	C-6982-T	Stummer Austausch	16 K Fragment	3 A2	<0.01
Patient 6	C-7111-G	Stummer Austausch	CLIP	3 A2	<0.01
Patient 4/2**	C-7285-T	Stummer Austausch	γ -LPH	3 B	<0.01
Patient 5/2**	C-7285-T	Stummer Austausch	γ -LPH	3 B	<0.01

Tabelle 34: Übersichtstabelle aller Varianten im POMC-Gen bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen

***Basenposition nach der Sequenz von Takahashi [Takahashi et al., 1983]

** Pat 4 und 5 tragen je eine Mutation in POMC-Fragment 3A2 und 3B

*Abschnitt des POMC-Genes bzw. Genproduktbereich, in dem sich die Variante befindet

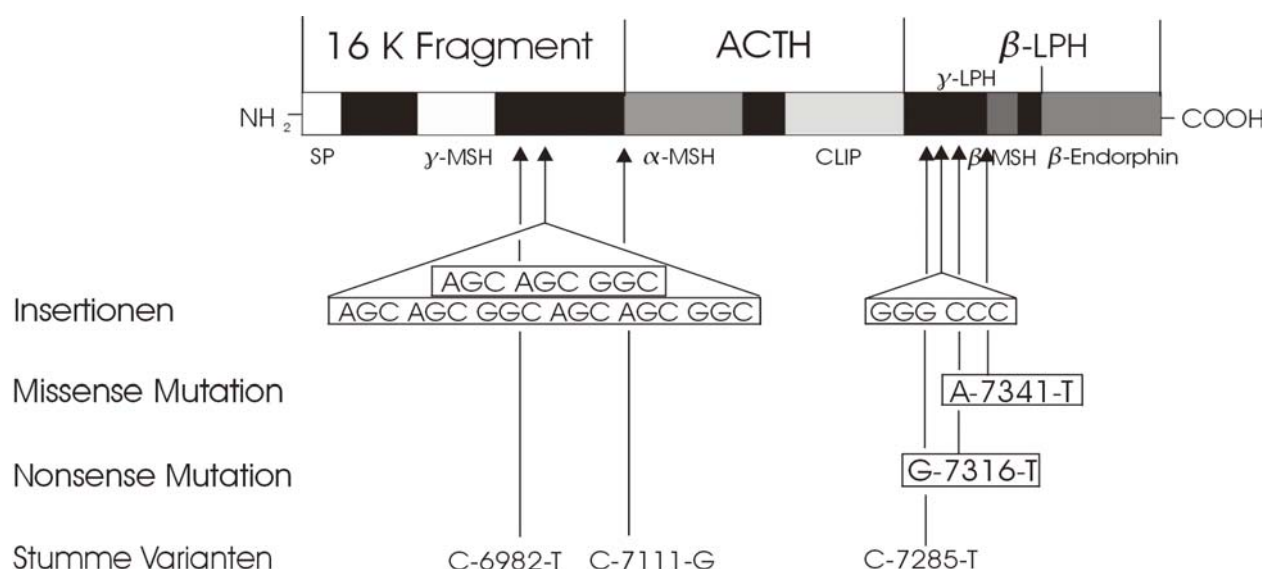


Abbildung 11: Diagramm des POMC-Gens mit den einzelnen Varianten aus Tabelle 34

Positionsangaben der Varianten und Polymorphismen nach der Sequenz von Takahashi et al., 1983.

ACTH: adrenocorticotropin; SP: Signal Peptid; CLIP: corticotropin like intermediate peptide; β -LPH und γ -LPH: β - und γ -lipotropin; α -, β - und γ -MSH: α -, β - und γ -Melanozyten stimulierendes Hormon

3.1.2. Darstellung der SSCA- Befunde

Die SSCA-Banden der Probanden mit Mutationen sind für Fragment 3a2 in **Abbildung 11** und für Fragment 3 b in **Abbildung 12** dargestellt.

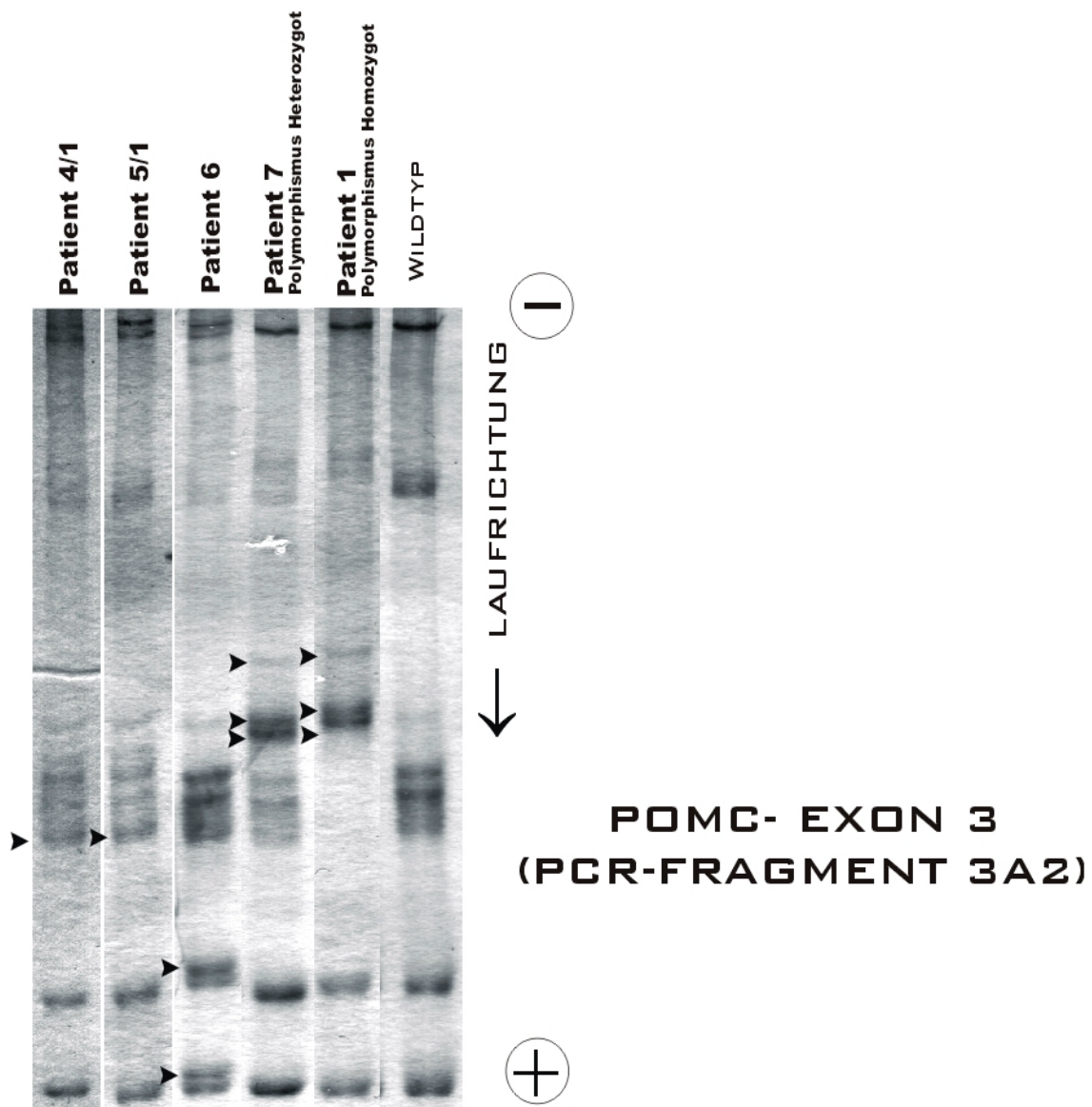


Abbildung 11: SSCA-Bandenmuster von Varianten und Wildtyp im PCR-Fragment 3 a2 des Exons 3 des POMC-Gens

Fotografische Darstellung von SSCA-Gelen nach Silberfärbung; alle Banden stammen aus einem Lauf und wurden nachträglich zusammengestellt (Pat. 1: Homozygot für 9 Bp-Insertion; Pat. 7: Heterozygot für 9 Bp Insertion; Pat. 4, 5, 6 : Stumme Basenaustausche)

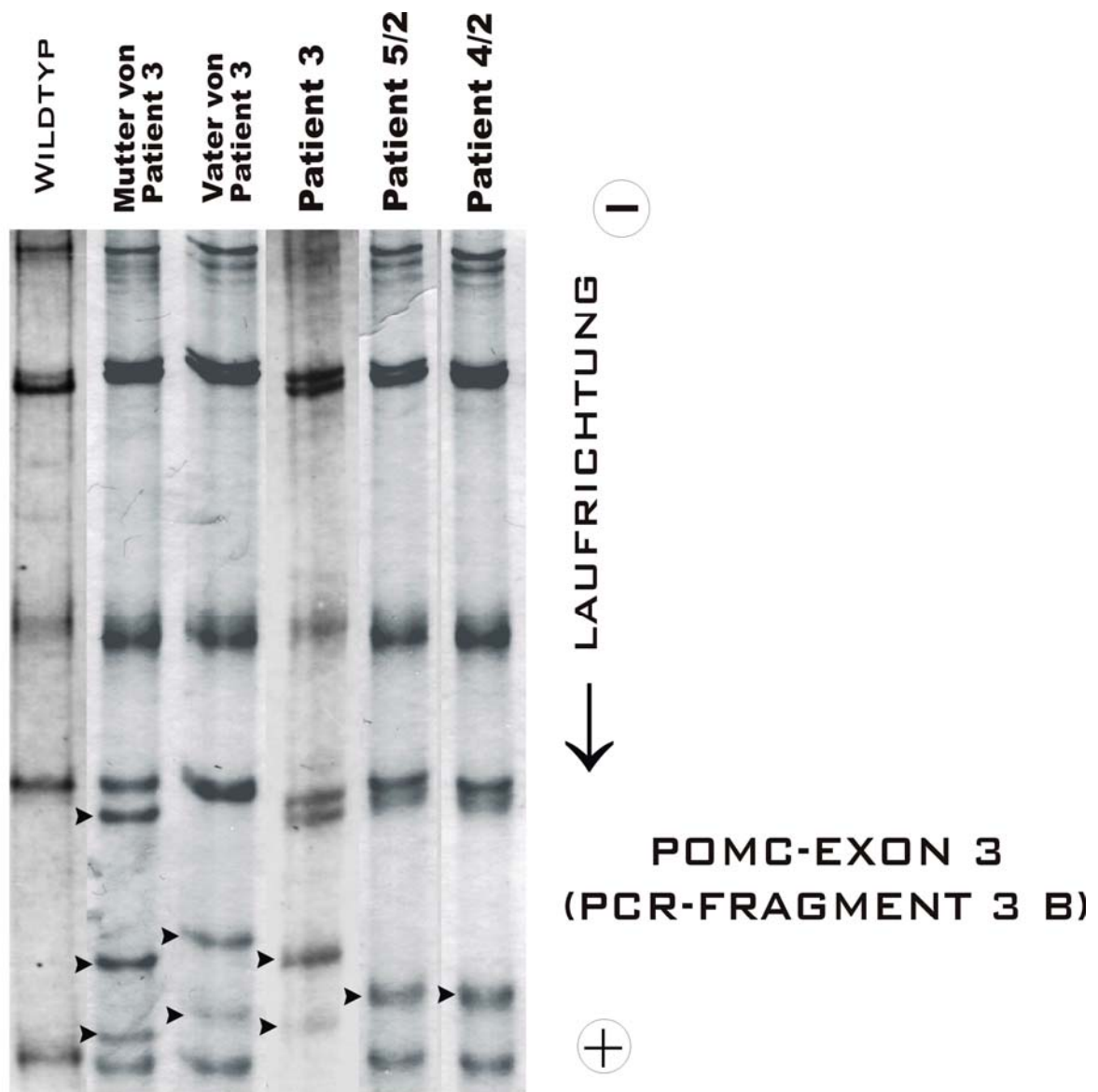


Abbildung 12: SSCA-Bandenmuster von Varianten und Wildtyp im PCR-Fragment 3 b des Exons 3 des POMC-Gens

Fotografische Darstellung von SSCA-Gelen nach Silberfärbung; alle Banden stammen aus einem Lauf und wurden nachträglich zusammengestellt (Pat. 3: Nonsense-Variante, Beide Elternteile des Pat. 3, Pat. 4 und 5: Stumme Basenaustausche)

3.2. Einzeldarstellung der Varianten

3.2.1. Patient 1

Der Patient, an dem die 9-Basenpaar Insertion exemplarisch dargestellt wird, hatte im Alter von 14 Jahren einen BMI von **32.2 kg/m²**. Dies entspricht dem 100. BMI-Perzentil. Sein Taille/Hüften-Verhältnis lag bei **0.97**. Er ist homozygot, beide Elternteile sind heterozygot für die Variante.

Es handelt sich bei der Variante um eine 9-Basenpaar-Insertion mit der Basenabfolge **AGC-AGC-GGC** zwischen Position 6997 und 6998 der Sequenz nach Takahashi . Dadurch werden die Aminosäuren **Serin-Serin-Cystin** zwischen **Codon 99 und 100** eingefügt. Bei Patient 1 tritt dieser Polymorphismus homozygot auf und wird deshalb repräsentativ für die anderen Variantenträger dargestellt. Da der Einschub '*in frame*', das heißt genau zwischen zwei benachbarten Basentriplets, stattfindet, wird die Abfolge der nachfolgenden Aminosäuren nicht verändert, und es kommt auch nicht zu einem Kettenabbruch.

Diese Variante ist ein Polymorphismus mit einer Allelfrequenz von **5.2%** im gesamten Kollektiv. Es wurden keine Frequenzunterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen des Kollektivs gefunden, der **Pearson χ^2 - Test** ist nominal **P> 0.5**.

Die Position der Variante befindet sich im 16-K Fragment. Dies ist ein Abschnitt des POMC-Gens, dessen Funktion noch weitgehend unbekannt ist.

Abbildung 13 zeigt den mutierten Genabschnitt des Patienten und den gleichen Genabschnitt einer gesunden Kontrollperson (Wildtyp). Die eingeschobenen Basen sind zusätzlich hervorgehoben. Die der Insertion folgende Gensequenz entspricht dem Genabschnitt der Kontrollperson lediglich um neun Basen verschoben.

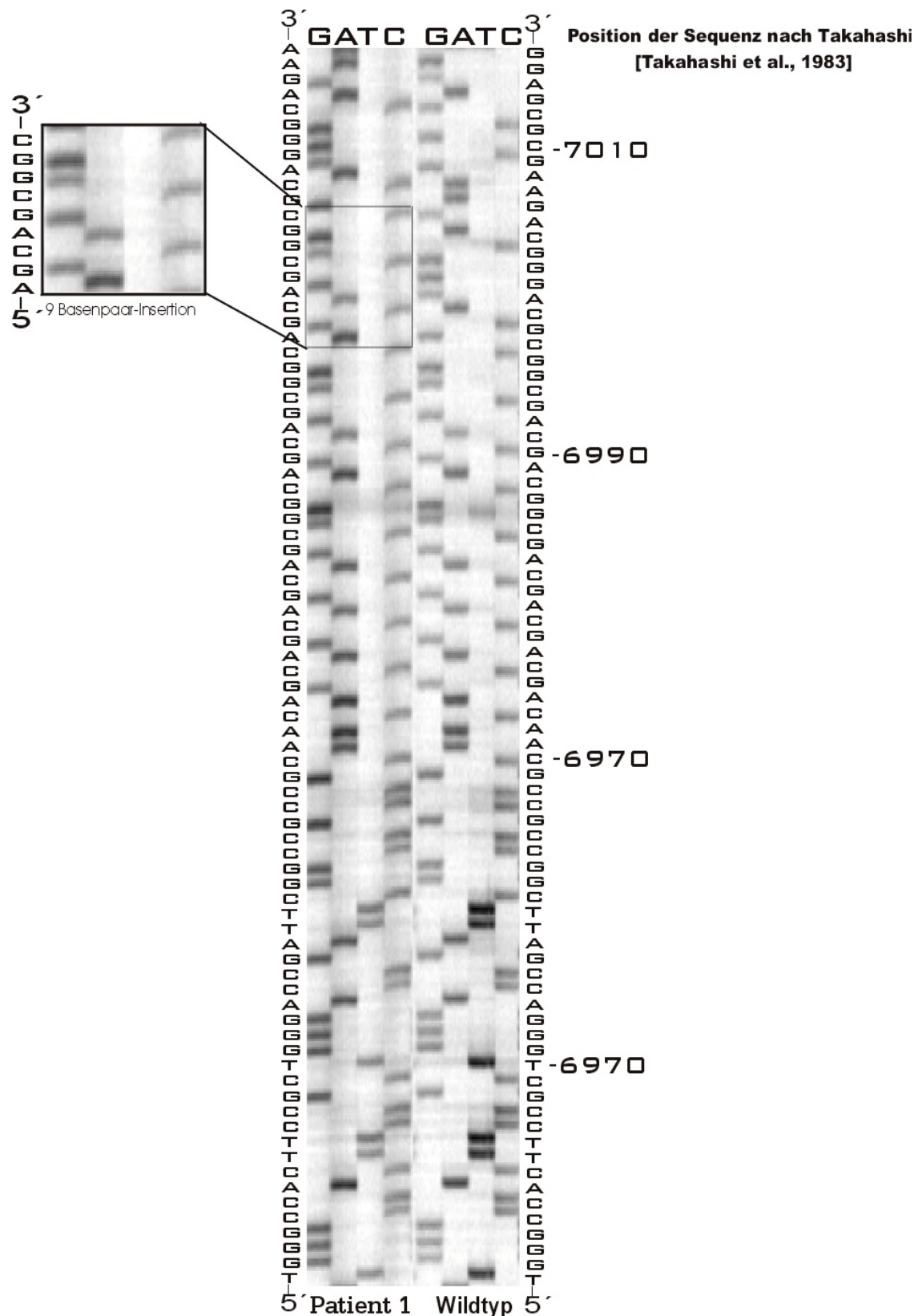
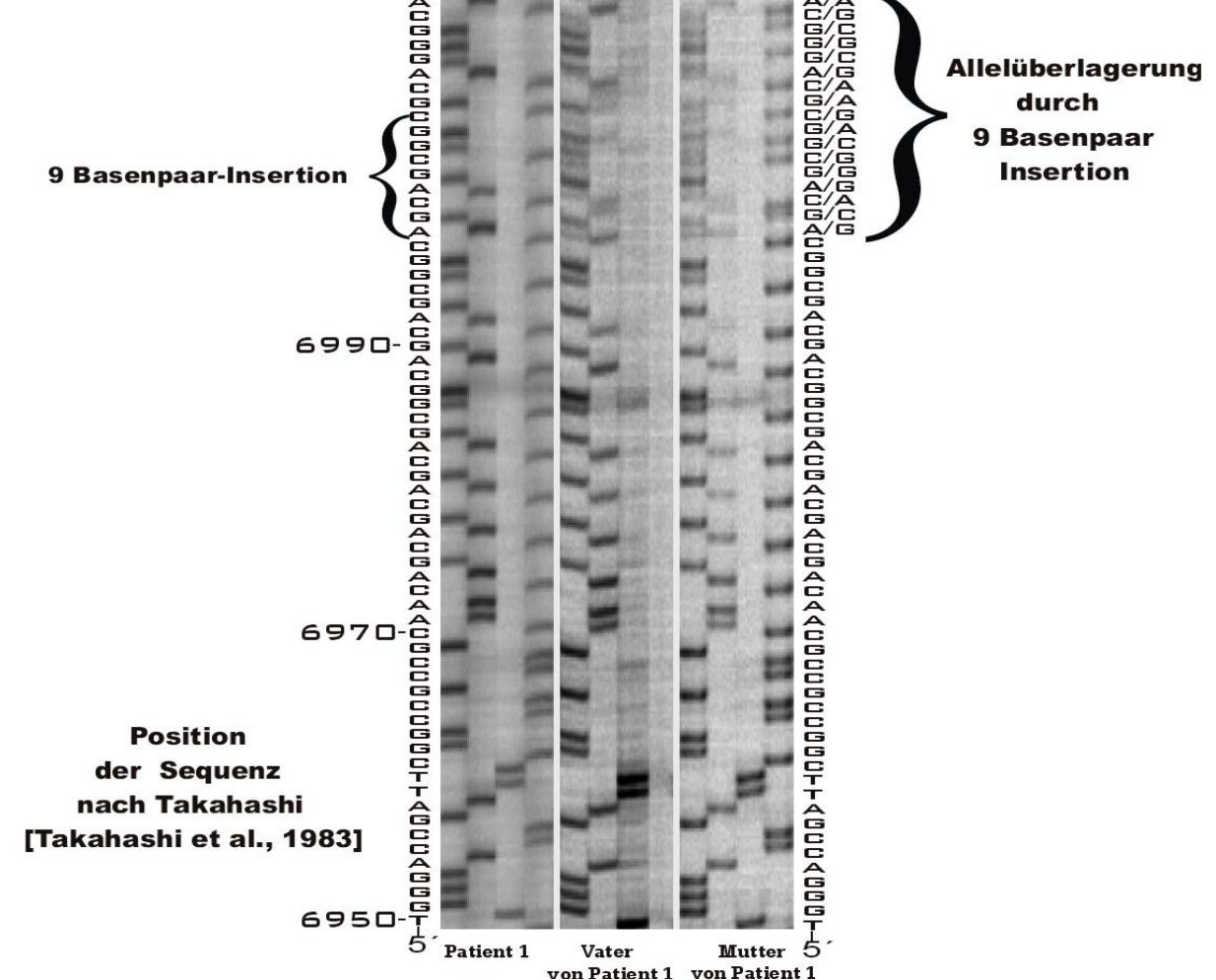


Abbildung 13: 9-Bp-Insertion (AGC-AGC-GGC) in die DNA des Patienten 1 und Genabschnitt einer Kontroll-DNA (Wildtyp) des gleichen Bereichs im POMC-Gen

Softwareunterstützte Darstellung eines Sequenzgels auf dem Li-cor Sequenzer 4200. G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin

Da die Eltern heterozygote Träger der Insertion sind, zeigt das Sequenzgel ab dem Punkt der Insertion eine Überlagerung des mutierten Allels und des Wildtyp-Allels.

3' GATC GATC GATC 3'



Softwareunterstützte Darstellung eines Sequenzgels auf dem Li-cor Sequenzer 4200. G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin

3.2.2. Patientin 2

Die Patientin mit einem BMI von **36.4 kg/m²**, dies entspricht dem 100. BMI-Perzentil, ist heterozygot für eine 18-Basenpaar Insertion.

Bei dieser Variante handelt es sich um eine 18- Basenpaar-Insertion mit der Basenabfolge **AGC-AGC-GGC-AGC-AGC-GGC** zwischen Position 6997 und 6998 der Takahashi-Sequenz. Dadurch werden die Aminosäuren **Serin-Serin-Cystin Serin-Serin-Cystin** zwischen **Codon 99 und 100** eingefügt. Da der Einschub '*in frame*' stattfindet, wird die Abfolge der nachfolgenden Aminosäuren nicht verändert, und es kommt auch nicht zu einem Kettenabruch. Die Variante entspricht einer Verdoppelung der **9-Bp Insertion** (siehe 3.2.1.) an derselben Position im POMC-Gen.

Da die **18-Basenpaar-Insertion** bei der Patientin 2 heterozygot vorliegt, wurden vor der Sequenzierung beide Allele getrennt und danach separat sequenziert, so daß man in dem separierten, die Variante enthaltenden Allel die Insertion eindeutig darstellen konnte. Die Trennung wurde auf einem langen 'low-melting' Agarose-Gel durchgeführt. Nach einer Laufzeit von zwei Stunden waren beide Allele aufgrund ihres Unterschieds in Länge und Gewicht verschieden weit im elektrischen Feld der Elektrophorese gewandert und konnten somit separat aus dem Agarose-Gel extrahiert und für die Sequenzierung präpariert werden.

Abbildung 15 zeigt einen Genabschnitt des **mutierten Allels** und den gleichen Genabschnitt des **Wildtyp-Allels**. Die eingeschobenen Basen sind zusätzlich hervorgehoben. Die der Insertion folgende Gensequenz entspricht dem Genabschnitt des Wildtyp-Allels lediglich um 18 Basen verschoben.

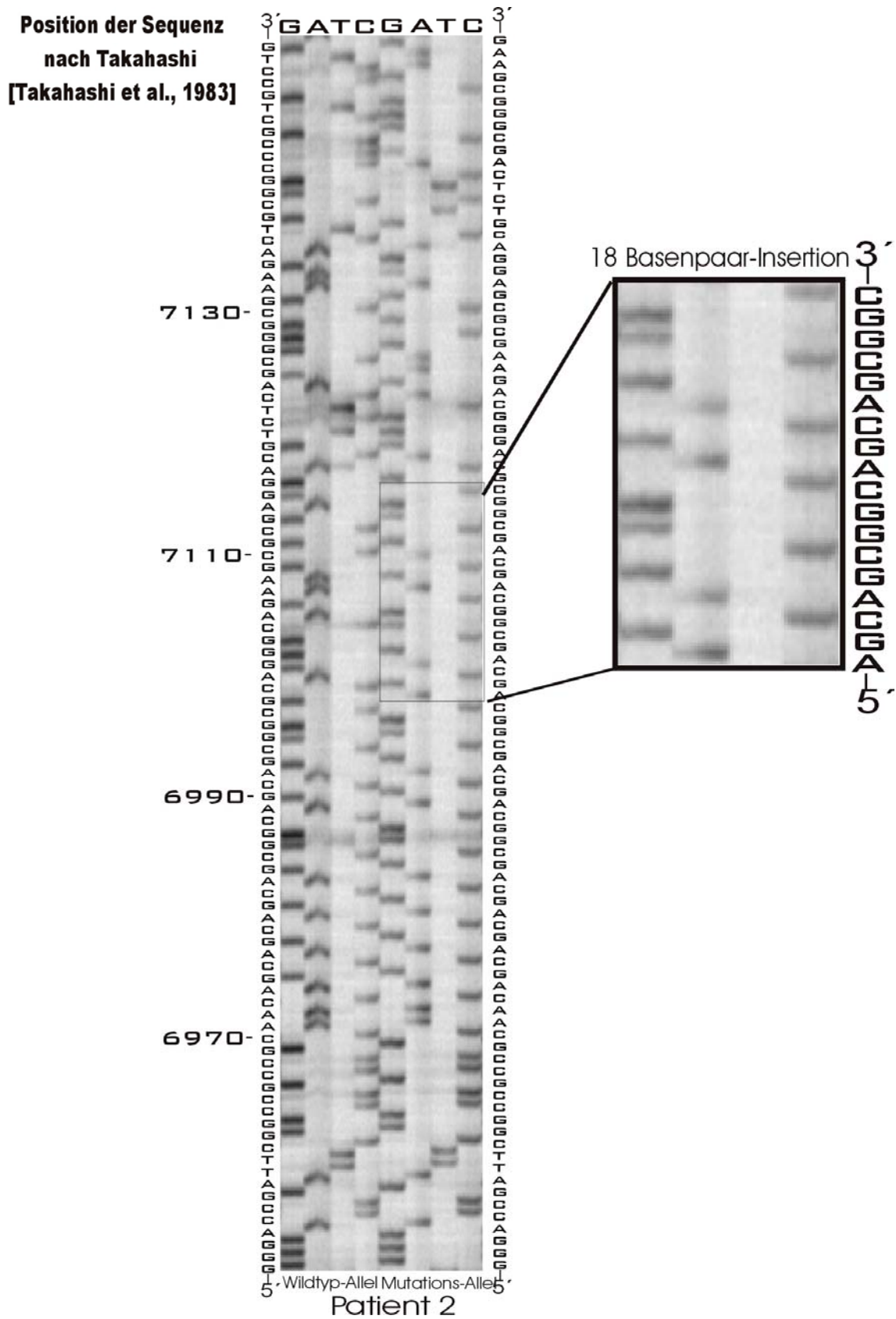


Abbildung 15: Wildtyp-Allel (links) und mutiertes Allel (rechts) von Patientin 2 mit heterozygoter 18- Bp-Insertion (AGC-AGC-GGC-AGC-AGC-GGC) im POMC-Gen

Softwareunterstützte Darstellung eines Sequenzgels auf dem Li-cor Sequenzer 4200. G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin

3.2.3. Patientin 3

Die Patientin 3 hatte im Alter von 16.5 Jahren einen BMI von **35.9 kg/m²**, dies entspricht dem 100. BMI-Perzentil. Ihr Taille/Hüften-Verhältnis lag bei **0.83**. Sie ist heterozygot für drei unterschiedliche Varianten:

1. Eine **6-Basenpaar-Insertion** mit der Basenabfolge **CCC-GGG** zwischen Position 7304 und 7305 der Sequenz nach Takahashi mit einem Einschub der Aminosäuren **Arginin-Alanin** in **Codon 202**. Der Einschub erfolgt zwischen den Basen eines für eine Aminosäure kodierenden Triplets und ist somit '*Out of Frame*'; durch die gerade Anzahl der eingefügten Aminosäuren kommt es jedoch nicht zu einem '*Frame-shift*', welcher die völlige Veränderung des folgenden kodierenden Bereichs zur Folge hätte, sondern nach der Insertion wird die Wildtypsequenz fortgesetzt und die nachfolgende Aminosäuresequenz bleibt unverändert. Die Insertion befindet sich im Genbereich, der für **γ -Lipotropin** kodiert.
2. Ein **G-7316-T Basenaustausch** im Allel, das auch die 6-Basenpaar-Insertion enthält. Dieser Basenaustausch führt zu einem Basentriplet (TAG), das für einen **Transkriptions-Stop** kodiert, und hat damit einen Kettenabbruch der m-RNA zur Folge. Dadurch werden die Hormone **β -MSH** und **β -Endorphin** auf diesem Allel nicht kodiert und auch nicht hergestellt.
3. Ein **Basenaustausch A-7341-G** führt zu einer '*Missense Variante*' des **Codons 214** von **Glutamat**→**Glycin**.

Die Varianten 1 und 2 wurden von der Mutter, die bei einem Alter von 35.6 Jahren einen BMI von 28.3 kg/m² (86. Perzentil) aufweist, die Variante 3 vom Vater (35.7 Jahre, BMI: 30.4 kg/m²) weitervererbt.

Da beide Allele der Patientin Varianten aufweisen, spricht man in diesem Fall von einer '**compound heterozygotie**'.

Abbildung 16 zeigt die Varianten 1 (6-Bp-Insertion) und 2 (Basenaustausch) in einer chromatographischen Darstellung des Sequenzgel-Ausschnitts der Probandin 3. Da die Insertion nur heterozygot vorhanden ist und sich die beiden Allele aufgrund der geringen Masseunterschiede auch nicht separieren und einzeln sequenzieren ließen, ist durch die Überlagerungen die Darstellung der Mutationen erschwert.

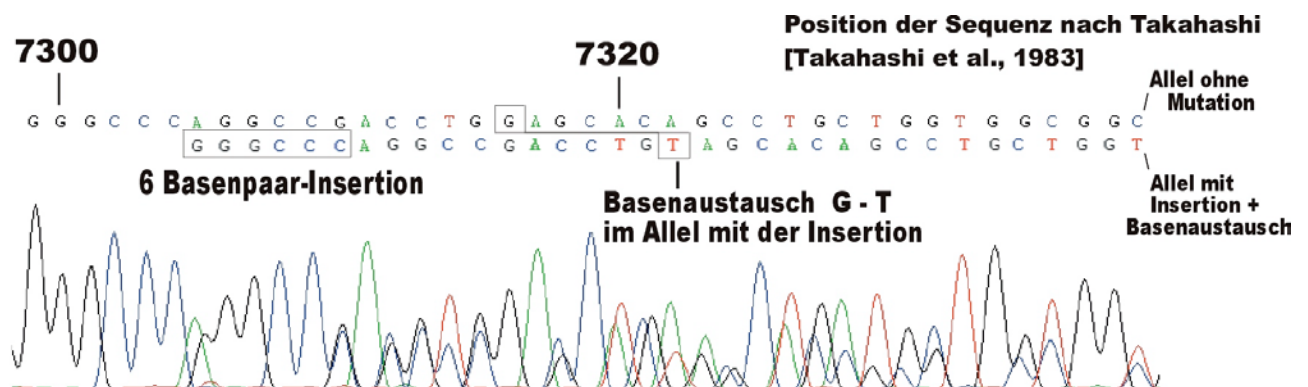


Abbildung 16: Heterozygote 6-Basenpaar-Insertion und G→T (Stop-Variante) Basenaustausch im POMC-Gen bei Patientin 3

Chromatographische-softwareunterstützte Darstellung eines Sequenzgels mit Base ImageR Software.
G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin

In **Abbildung 17** ist Variante 3 bei Patientin 3 dargestellt. Diesen Basenaustausch hat die Patientin von ihrem Vater geerbt.

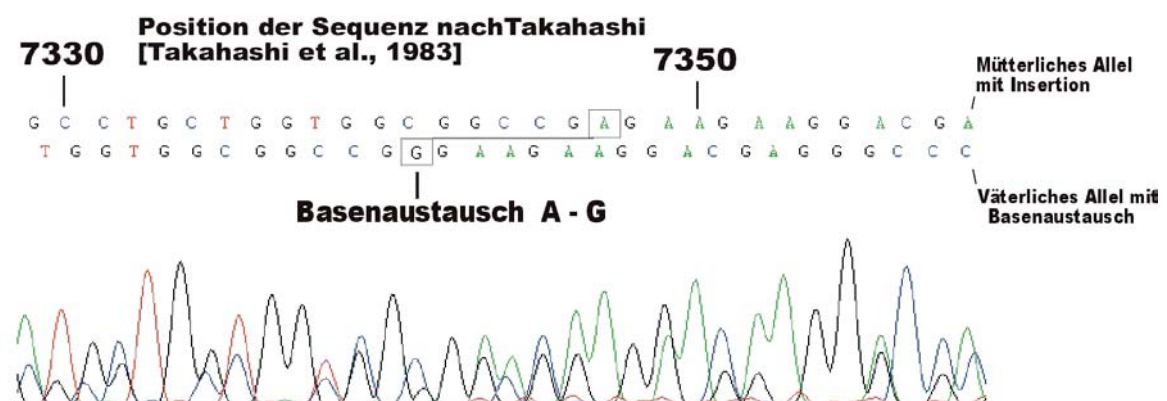


Abbildung 17: Heterozygoter Adenin→Guanin Basenaustausch im väterlichen Allel des POMC-Gens bei Patientin 3

Chromatographische-softwareunterstützte Darstellung eines Sequenzgels mit Base ImageR Software.
G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin

Um die Segregation des in **Abbildung 17** beschriebenen Basenaustauschs zu beweisen, ist in **Abbildung 18** der entsprechende Bereich der väterlichen DNA dargestellt.

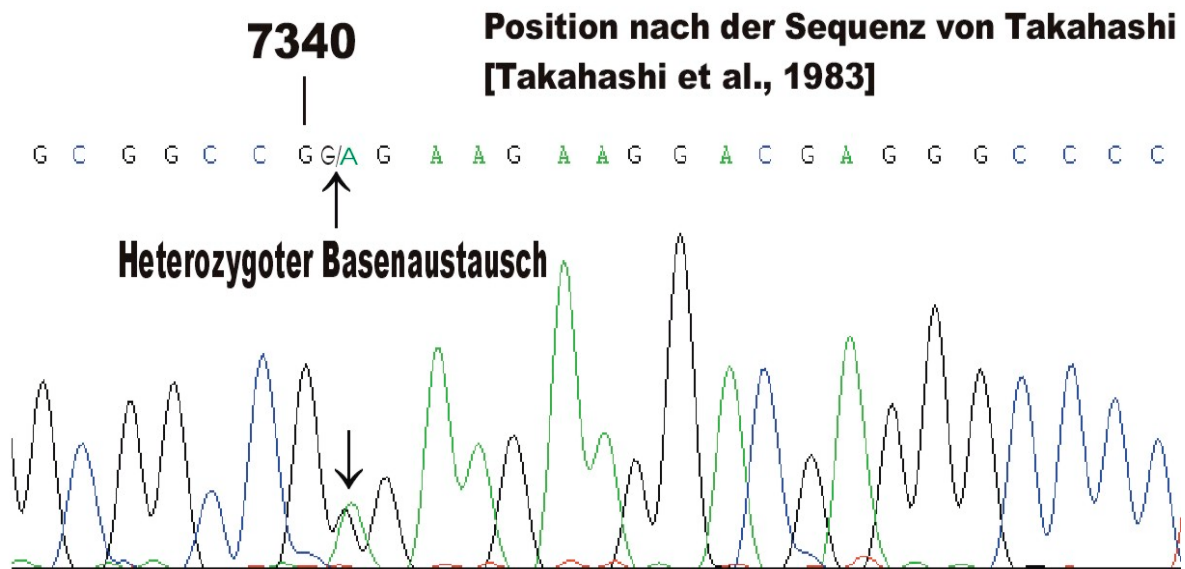


Abbildung 18: Heterozygoter Adenin→Guanin-Basenaustausch im POMC-Gen beim Vater von Patientin 3

Chromatographische-softwareunterstützte Darstellung eines Sequenzgels mit Base ImageR Software.
G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin

3.2.4. Patientinnen 4 und 5

Die Patientinnen 4 und 5 tragen beide jeweils zwei identische Varianten. Die Patientinnen sind 12.9 und 13.1 Jahre alt und haben einen BMI von **36.9** und **32.8 kg/m²**.

1. **Variante 1** ist ein **Cytosin→Thymin-Basenaustausch** an **Position 6982** der Takahashi-Sequenz. Die Aminosäure Serin in Codon 94 wird durch den Austausch nicht verändert, es handelt sich somit um eine stumme Variante im **16-K Fragment** des POMC-Gens.
2. Bei **Variante 2** handelt es sich ebenfalls um einen **Cytosin→Thymin-Basenaustausch** an **Position 7285** der Takahashi-Sequenz. Die Aminosäure Alanin in Codon 195 wird durch den Austausch nicht verändert, es handelt sich somit auch um eine stumme Variante, jedoch im Bereich, der für **γ-LPH** kodiert.

Da die Mutationen der beiden Patientinnen identisch sind, wird jeweils nur die Variante einer Probandin graphisch dargestellt, die damit auch repräsentativ für die andere Patientin ist.

In **Abbildung 19** ist die heterozygote **Variante 1** einem Wildtyp-Ausschnitt gegenübergestellt.

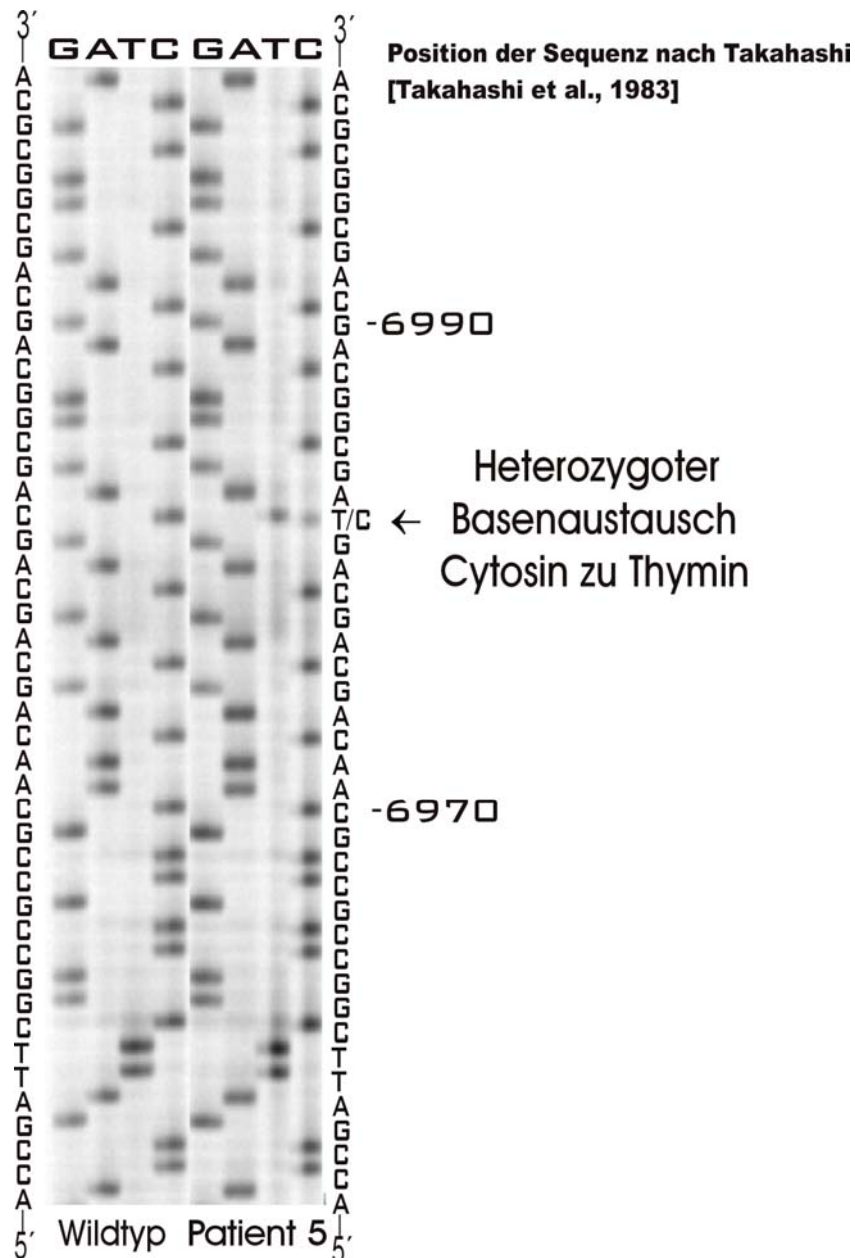


Abbildung 19: Sequenzierungsausschnitt von Wildtyp-DNA (links) und von DNA der Patientin 5 (rechts) mit heterozygotem Basenpaar-Austausch (Cytosin→Thymin) im POMC-Gen

Softwareunterstützte Darstellung eines Sequenzgels auf dem Li-cor Sequenzer 4200. G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin

Abbildung 20 zeigt die homozygote **Variante 2** und als Kontrolle eine Wildtyp DNA-Sequenz.

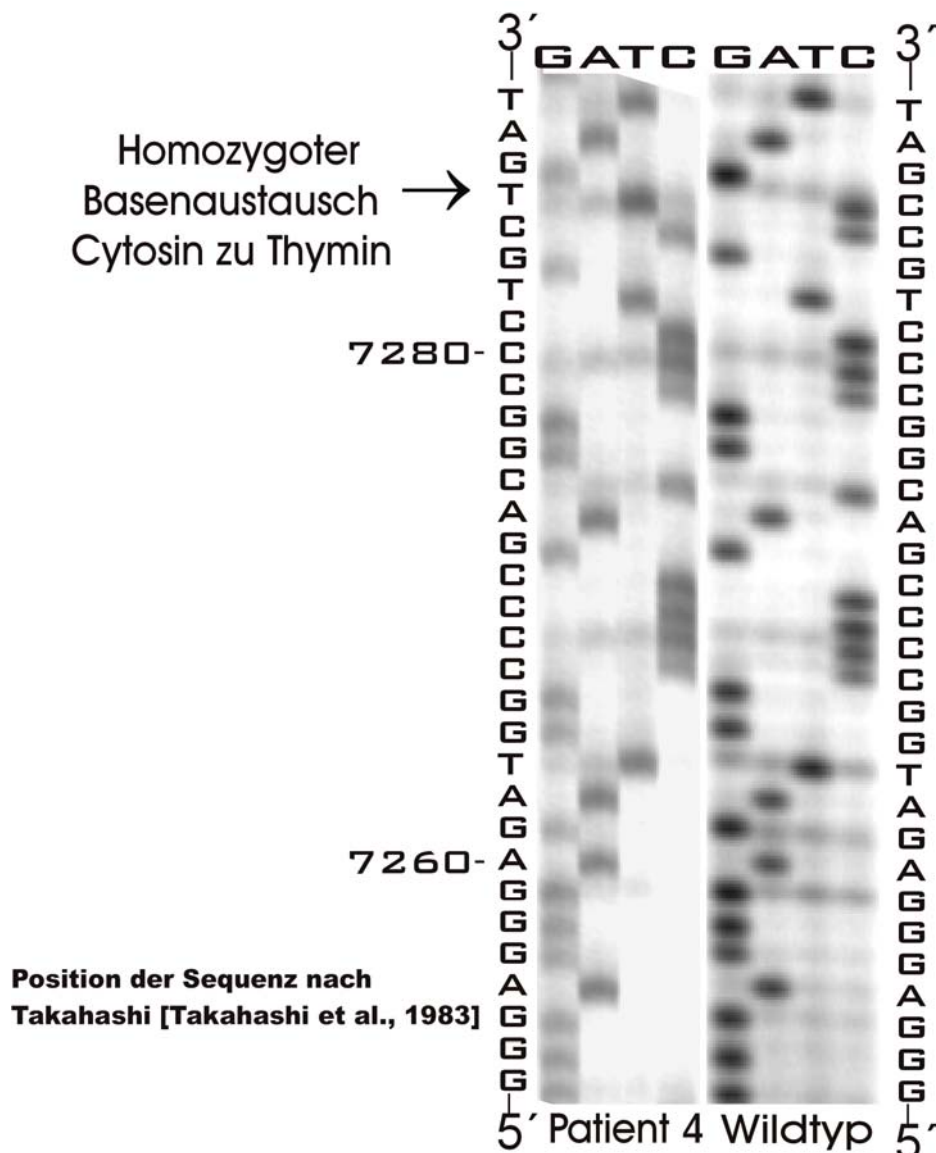


Abbildung 20: Sequenzierungsausschnitt von Wildtyp-DNA (rechts) und von DNA der Patientin 4 (links) mit homozygotem Basenpaar-Austausch (Cytosin → Thymin) im POMC-Gen

Softwareunterstützte Darstellung eines Sequenzgels auf dem Li-cor Sequenzer 4200. G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin

3.2.5. Patientin 6

Die übergewichtige Patientin zeigt eine stumme Variante an **Position 7111** der Takahashi-Sequenz. Es wird **Cytosin → Guanin** ausgetauscht. Der Basenaustausch befindet sich im DNA-Abschnitt, der für das 'Corticotropin like intermediate lobe peptide' (CLIP) kodiert.

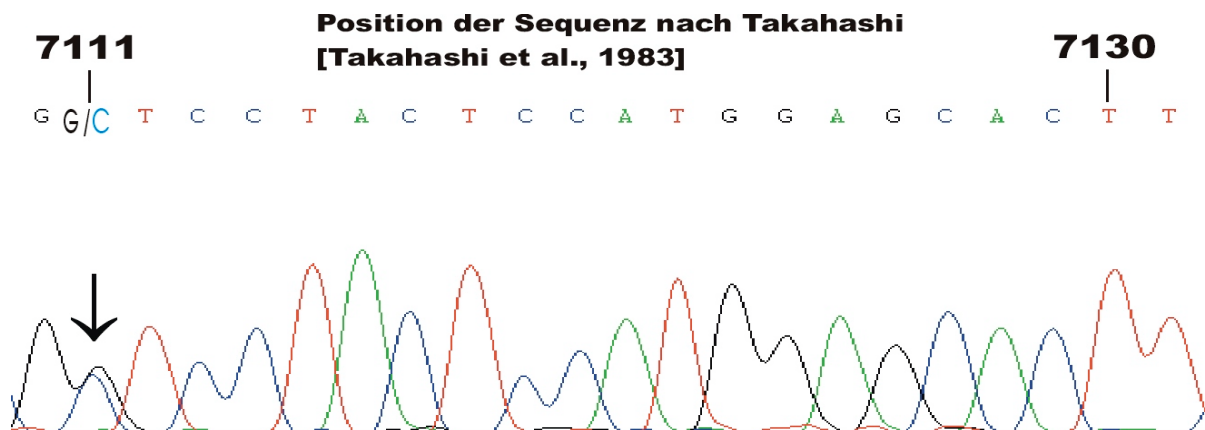


Abbildung 21: Heterozygoter Cytosin→Guanin Basenaustausch im POMC-Gen bei Patientin 6

Chromatographische-softwareunterstützte Darstellung eines Sequenzgels mit Base ImageR Software.
G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin

3.3. Statistische Ergebnisse

Nach der Detektion der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Varianten im POMC Gen wurde eine statische Auswertung der gefundenen Ergebnisse durch PD Dr. A. Ziegler, Biometrie, Philipps Universität Marburg, durchgeführt.

Bei diesen Berechnungen wurde nur die **9 Bp Variante (AGC AGC GGC)** im Fragment 3a2 berücksichtigt, da es sich bei dieser Variante um einen **Polymorphismus** mit einer **Allelfrequenz von 5,2%** in der Gruppe der adipösen Patienten handelt. Sämtliche anderen gefunden Varianten weisen nur eine Allelfrequenz unter 1% auf und eignen sich somit nicht für eine statistische Auswertung.

Als Kontrollgruppe wurde die Kohorte von **60 untergewichtigen Studenten** der Probandengruppe von **96 adipösen Patienten** gegenübergestellt.

Das Auftreten einer **heterozygoten Variante** des 9 Bp Polymorphismuses war mit **8,33%** sowohl in der Probanden als auch in der Kontrollgruppe gleich häufig. Die einzige **homozygote Ausprägung** des 9 Bp Polymorphismuses fand sich allerdings nur in der Probandengruppe.

Die Allelfrequenz in der **Kontrollgruppe lag bei 4,17%** und differierte nur gering von der Allelfrequenz der Probandengruppe (5,21%). Daraus errechnet sich ein **Pearson χ^2 -Wert**, von nominal **P>0,5** und dies spricht gegen eine signifikante Assoziation von Adipositas und Vorhandensein des 9 Bp Polymorphismuses.

In **Tabelle 35** sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung für den 9 Bp-Polymorphismus in Probanden- und Kontrollgruppe dargestellt.

	Genotypen						
	Genotypenhäufigkeiten						
	Gesamt	Wildtyp	Mutation	heterozygot	%Wildtyp	%Mutation	%heterozygot
Adipositas	96	87	1	8	90,63%	1,04%	8,33%
Untergew. Studenten	60	55	0	5	91,67%	0%	8,33%
	Allele						
	Allelhäufigkeiten			Erwartungswerte		Hardy-Weinberg-Gleichgew.	
	Gesamt	Wildtyp	Mutation	%Wildtyp	%Mutation	HMG T-Wert	HMG P-Wert
Adipositas	192	182	10	94,79%	5,21%	2,34	0,31
Untergew. Studenten	120	115	5	95,83%	4,17%	0,11	0,94

Tabelle 35: Tabellarische Darstellung der statistisch ermittelten Ergebnisse des 9 Bp-Polymorphismus

Genotypenhäufigkeiten, Allelhäufigkeiten, Erwartungswerte und Hardy-Weinberg Gleichgewichte in adipöser Kohorte und untergewichtiger Kontrollgruppe. Hardy-Weinberg-Gleichgewicht Berechnung wie in Abschnitt 2.10.2 erläutert.
(Berechnungen durch PD Dr. A. Ziegler, Biometrie, Philipps Universität Marburg)

4. DISKUSSION

Frühere Adipositas-Studien:

Wie in der Einleitung in Kapiteln 1.2.1 ausführlich dargestellt wurde, sprechen verschiedenste Studien dafür, daß **genetische Faktoren** zu menschlicher Adipositas führen. In **Mausmodellen** führten Defekte im Leptin-Gen in *ob/ob*-Mäusen oder im Leptin-Rezeptor-Gen in *db/db*-Mäusen zu ausgeprägter Adipositas. Trotz einzelner Beispiele von monogenen Formen der Adipositas wird beim Menschen eher von einer polygenen Gewichtsregulation ausgegangen. Mit Hilfe von Kopplungsanalysen wurden verschiedene Kandidatengenregionen für Adipositas postuliert. Comuzzie et al. stellten 1997 fest, daß das Vorhandensein hoher **Leptin-Plasmaspiegel** und ausgeprägter Fettmasse an das menschliche Chromosom 2 gekoppelt ist [Comuzzie et al., 1997]. Dies spricht für ein gewichtsregulatorisches Gen in dieser Region. Das **Proopiomelanocortin-Gen** hat die **Position 2p23** im menschlichen Genom [Zabel et al., 1983] und kommt somit als eines der Kandidaten-Gene in Frage. Der Nachweis **dreier Mutationen** im POMC-Gen, die zu einer früh-ausgeprägten Adipositas führten [Krude et al., 1998], und die Interaktion von POMC-Gen und Leptin in lethal-yellow Mäusen, unterstreicht die Rolle des POMC-Gens in bezug auf die **Gewichtsregulation** [Boston et al., 1997].

Die Methodik dieser Arbeit:

Diese Arbeit beschreibt den **systematischen Mutationsscreen** des POMC-Gens. Die Amplifizierung der das POMC-Gen enthaltenden Genabschnitte wurde mittels PCR durchgeführt. Da schon geringste Mengen DNA als Amplifikationsvorlage ausreichen, ist ein sauberes und vorsichtiges Arbeiten erforderlich, um eine **Verunreinigung** der DNA mit PCR-Produkten zu vermeiden. Durch die strikte räumliche Trennung von Vor- und Nach-PCR- Bereichen wurde diese Fehlerquelle minimiert.

Zur Kontrolle, daß auch das gewünschte DNA-Fragment und nicht etwa ein ganz anderer Bereich des Genoms vervielfältigt worden war, wurde die Größe und Qualität jedes PCR-Produkts mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Ein mitlaufender DNA-Marker machte die Längenkontrolle möglich. Ein durch seine im Agarose-Gel differente Laufweite auffallendes fehlerhaftes PCR-Amplifikat oder eine

positive H₂O-Kontrolle hätten zur Wiederholung der Reaktion geführt.

Die Mutationssuche in den durch PCR amplifizierten Fragmenten des POMC-Gens wurde mittels SSCA durchgeführt. Die SSCA ist als Screeningverfahren von DNA-Fragmenten weit verbreitet. Die **Sensitivität** dieser Methode zur Mutationsdetektion ist abhängig von der Länge der analysierten Fragmente. Bei PCR-Fragmenten mit einer Länge von bis zu 250 Bp liegt ihre Sensitivität zwischen **70 und 95 %** [Markoff et al., 1997]. Da die POMC-Fragmente 3a2 und 3b mit 446 bzw. 550 Bp deutlich über der Sensitivitätsgrenze liegen, wurde der SSCA eine Digestion, die zu Stücken zwischen 205 und 332 Bp Länge führte, vorangestellt. Zur weiteren Sensitivitätserhöhung wurde zusätzlich zur Analyse bei Raumtemperatur für jedes Fragment und jede Probe eine SSCA bei 4° C vorgenommen. Alle Proben mit auffälligem oder nicht eindeutigem Ergebnis wurden sequenziert.

Um ein möglichst reines Template für die Sequenzierung zu verarbeiten, wurde jede zu sequenzierende Probe zuvor mittels **Quia-Quick** und **low-melting-Agarose** aufgereinigt (vgl. Kap 2.9.2.2. und 2.9.2.3.).

Es fand stets eine bidirektionale Sequenzierung in getrennten Reaktionen statt. Dadurch ließen sich vor allem heterozygote Mutationen sicher bestätigen. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurde die jeweilige Sequenzierung wiederholt und zusätzlich eine Sequenzierung bei einer Firma in Auftrag gegeben, um die eigenen Ergebnisse abzusichern.

Gefundene Ergebnisse:

Als Ergebnis wurden acht verschiedene Varianten gefunden und durch Sequenzierung identifiziert: Eine **9-Basenpaar-Insertion** (AGC-AGC-GGC) sowie eine **18-Basenpaar-Insertion** (AGC-AGC-GGC)₂ im Bereich des 16-K Fragments, eine **6-Basenpaar-Insertion** (GGG-CCC) im für das γ -Lipotropin kodierenden Bereich, **zwei Punktvarianten** (G→T; A→G) im für das γ -Lipotropin kodierenden Bereich, von denen eine zu einem Kettenabbruch führt (**Nonsensevariante**), und fünf Basenpaar-Austausche, bei denen sich die ursprüngliche Aminosäuresequenz nicht ändert. Keine der gefundenen Varianten ist mit früher gefundenen Veränderungen im POMC-Gen identisch.

9- und 18-Bp Polymorphismus im 16-K Fragment des POMC-Gens:

Der größte Teil der hier identifizierten Varianten und Polymorphismen liegt in dem Bereich des **POMC-Gens**, der als **16-K Fragment** bezeichnet wird und unter anderem für γ -MSH kodiert. Die exakte Funktion dieses Bereichs ist noch unbekannt. In aus Meerschweinchen isolierten adrenalen Zellen führt die Expression des 16-K Fragments zu einem **Anstieg** von **Cortisol** und **Androstenedion** im Serum bei zugleich erniedrigter ACTH-Konzentration [O'Connell et al., 1993]. Das Hormonprodukt des 16-K Fragments scheint mit ACTH gemeinsam sekretiert zu werden [Bertagna et al., 1980]. Der Bereich des 16-K Fragments, der für das MSH kodiert, und der davor liegende Bereich sind zwischen Ratten, Kühen und Menschen nahezu identisch, es handelt sich daher um einen stark konservierten Bereich. Dies könnte für eine bis dato unbekannte biologische Funktion des Amino-Endes des 16-K Fragments sprechen [Drouin et al., 1980]. Die Arbeitsgruppe um Gostout identifizierte einen „**Cryptic trinucleotid repeat**“ bei drei zufällig ausgewählten Personen und fand drei unterschiedliche polymorphe Allele im Carboxyl-Ende des 16-K Fragments [Gostout et al., 1993]. Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Polymorphismus (Insertion der Basen AGC-AGC-GGC), bei Patient 1 homozygot vorhanden, stimmt von Position und Basensequenz mit den Ergebnissen von Gostout et al. überein. Die 18-Bp-Insertion (AGC-AGC-GGC)₂ bei Patient 2 ist eine Verdoppelung des 9-Bp-Polymorphismus, wurde als Einzelvariante aber nur einmal in unserem Kollektiv gefunden. Die statistisch ermittelte Allelfrequenz des 9-Bp-Polymorphismus von 0,052 in der Kohorte der adipösen Patienten ist allerdings ähnlich zu denen der untergewichtigen Kontrollgruppe (Allelfrequenz: 0,042). Dies läßt einen kausalen Zusammenhang dieser Insertionen mit dem Auftreten von Adipositas als eher unwahrscheinlich erscheinen. Auch der Vergleich der mittleren Plasma-Leptin-Werte von heterozygoten Trägern der 9-Basenpaar-Insertion und untergewichtigen Kontrollpersonen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Ursache dafür könnte aber auch in der geringen Anzahl von Personen, bei denen Plasma-Leptin-Werte bestimmt worden sind, liegen.

Morris beschrieb 1994 einen, '**Cryptic trinucleotid repeat Polymorphismus**' (Insertion der Basen AGC-AGC-GGC) an Position 6980 (Codon 94) nach Takahashi et al., 1983. Diese Insertion liegt 18 Bp vor dem in dieser Arbeit beschriebenen 9-Bp Polymorphismus [Morris et al., 1994]. Echwald untersuchte die Prävalenz dieses Cryptic trinucleotid repeat Polymorphismus bei 156 adipösen Personen und 205 normalgewichtigen Kontrollpersonen aus Dänemark. Er konnte keine Assoziation des

Polymorphismus mit Adipositas, Körperfettgehalt oder Serum-Leptin-Konzentrationen feststellen [Echwald et al., 1999a]. Delplanque nutzte ebenfalls den von Morris veröffentlichten 9-Bp-Polymorphismus, um eine Assoziationsstudie bei 192 nicht verwandten übergewichtigen (BMI 33,3 kg/m²) französischen Patienten und 189 normalgewichtigen (BMI 22,5 kg/m²) Kontrollpersonen durchzuführen. Die Polymorphismus-Frequenzen waren mit 0,05 in der übergewichtigen Gruppe fast genauso hoch wie in der Kontrollgruppe (0,06). Der Polymorphismus zeigte außerdem keine Assoziation mit Adipositas oder dem Glucose-Stoffwechsel. Aufgrund dieser Ergebnisse vermutet Delplanque, daß entweder eine noch unbekannte regulative Sequenz, die die Expression des POMC-Gens steuert, oder aber ein in direkter Nachbarschaft zum POMC-Gen liegendes unbekanntes Gen, das ebenfalls unabhängig vom POMC in die Gewichtsregulation eingreift, für die Verbindung dieses Genbereichs mit der Ausprägung von Adipositas bzw. Plasma-Leptin-Spiegeln verantwortlich ist. Die Ausweitung des „Human Genome Sequencing Project“ und die damit verbundene Veröffentlichung von neuen Genen in der chromosomalen Region 2p21-23 lassen für die Zukunft eine Erleichterung der Suche nach dem „obesity-Gen“ dieser Region erhoffen [Delplanque et al., 2000].

Die 6- Basenpaar-Insertion:

Die **6-Basenpaar-Insertion** in dem Bereich des POMC-Gens, der für das β - und γ -Lipotropin kodiert, ist eine zuvor noch nicht beschriebene Einzelmutation. Da die Funktion der Hormone β - und γ -Lipotropin allerdings weder im menschlichen noch im tierischen Organismus geklärt ist, läßt sich zur Bedeutung dieser Hormone und zu den Auswirkungen ihrer Defizienz keine konkrete Aussage machen. Hinzu kommt, daß die 6-Bp-Insertion im gesamten Kollektiv nur einmal gefunden wurde und somit keinesfalls eine häufige Ursache für die Entstehung einer Adipositas sein kann.

Entstehungsmechanismen der Insertionen im POMC-Gen:

Es ist anzunehmen, daß alle drei unterschiedlichen **Insertionen** (6, 9 oder 18 Basenpaare) durch „**slipped strand mispairing**“ verursacht worden sind. Bei diesem von Levinson et al. 1987 beschriebenen Mechanismus der DNA-Sequenz-Evolution entstehen durch unregelmäßiges „**crossing over**“ oder andere intrahelikale Vorgänge während der Meiose eine Duplikation und Insertion der umliegenden Basensequenz. Die 9- und 18-Basenpaar-Insertionen im POMC-Gen haben die Basenfolge **AGC AGC**

GGC (bei der 18-Basenpaar-Insertion wiederholt sich die 9-Bp-Insertion) und inserieren an **Position 6998** der Sequenz nach Takahashi [Takahashi et al., 1983]. Die 9 bzw. 18 Basen vor der Insertionsstelle, also der Bereich zwischen Position 6980 und 6994, entspricht in der Basenabfolge den Insertionen (siehe Abbildung 22 a, b). Bei der 6-Basenpaar-Insertion findet man die Basenabfolge **GGG CCC** in dem Bereich zwischen **Position 7298 und 7303** ebenfalls direkt vor der Insertion. Die Sequenz der Insertion ist mit dem vorangehenden Basen identisch (siehe Abbildung 22 c).

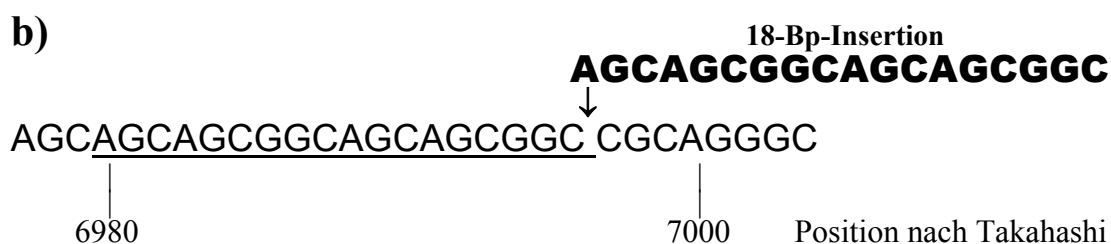
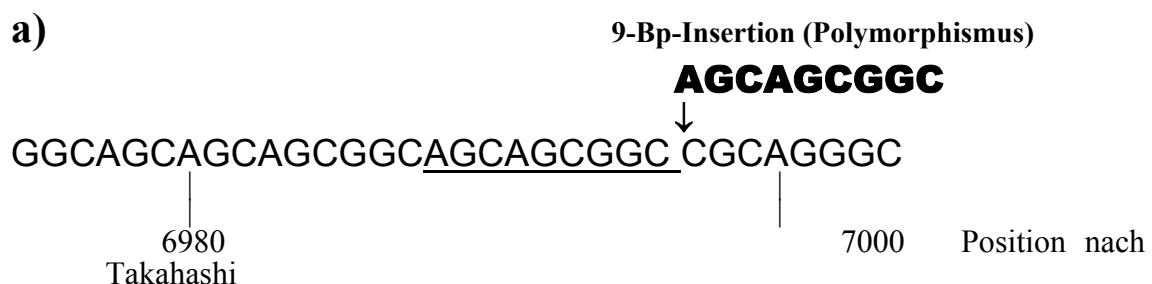


Abbildung 22: Darstellung möglicher Sequenzen, die durch slipped strand mispairing entstanden sein können, am Beispiel der a) 9-Basenpaar-Insertion b) 18-Basenpaar-Insertion und c) 6-Basenpaar-Insertion im Proopiomelanocortin-Gen

Fettgedruckt → Insertion, unterstrichen → identischer Genabschnitt vor der Insertion ;
Positionangaben nach Takahashi et al., 1983.

Die 6-, 9- und 18-Basenpaar-Insertionen stellen somit höchstwahrscheinlich eine **Verlängerung** der in der Wildtyp-Sequenz schon vorhandenen „Repeat“-Einheiten

dar. Der 9-Basenpaar-Polymorphismus könnte dabei in zukünftigen Kopplungs- und Assoziationsstudien als genetischer Marker dienen [Hinney et al., 1998].

Missense und Nonsense Mutation im POMC-Gen:

Die Trägerin der 6-Basenpaar-Insertion hatte noch zwei weitere Punktmutationen im POMC-Gen:

Beide Varianten befanden sich auf unterschiedlichen Allelen. Während der von **väterlicher Seite** geerbte, an Position 7341 identifizierte **Adenin→Guanin** Basenaustausch die Aminosäuresequenz ändert, führt die auf dem **mütterlichen Allel** befindliche Veränderung zu einem Stop-Codon (TAG-Basentriplet) und damit zu einem Abbruch der Proteinsynthese an dieser Stelle. Der Kettenabbruch an dieser Position sorgt dafür, daß die Hormone **β-MSH** und **β-Endorphin** vom mütterlichen Allel nicht kodiert werden können.

Rubinstein et al. klonen 1996 **β-Endorphin ,Knock out-Mäuse‘**, indem sie das Basentriplet, welches an Position 179 im POMC-Gen die Aminosäure Tyrosin kodierte, mittels *targeted mutagenesis* zu einem Stop-Codon umwandelten und damit die embryonalen Stammzellen von Mäusen veränderten. Die aus diesen Stammzellen entstandenen Mäuse zeigten eine normale Expression aller Hormone vor dem Kettenabbruch und eine normale Funktion der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Das Hormon **β-Endorphin** war bei homozygoten Knock-out-Mäusen weder im Hypothalamus noch in der Hypophyse nachweisbar. Neben einer kompensatorisch erhöhten Aktivität des **Nicht-Opiod-Systems** zeigten diese Mäuse nach normalem Geburtsgewicht und normaler körperlicher Entwicklung mit Beginn der Pubertät einen Anstieg des Körpergewichts von 10-15% im Vergleich zu Wildtyp Mäusen [Rubinstein et al., 1996].

Das Fehlen des β-Endorphins könnte also zumindest nach der Pubertät eine Ursache für eine Gewichtszunahme darstellen. Die Mutter der Patientin 3, selber heterozygote Trägerin dieser **Stop-Mutation**, ist allerdings mit einem BMI von 28.3 kg/m² (86. BMI-Perzentil) nicht als extrem adipös einzustufen. Daher erscheint die Annahme, daß das Fehlen von β-MSH und β-Endorphin zu extremer Adipositas führt, zumindest im heterozygoten Zustand eher unwahrscheinlich.

Da die Probandin aber auf dem väterlichen Allel zusätzlich eine Punktmutation trägt, könnte durch den Aminosäureaustausch **Glutamat-214-Glycin** die **Tertiärstruktur** der auf diesem Allel produzierten Hormone β-MSH, β-LPH oder γ-

LPH verändert sein und die Wirksamkeit der Hormone vermindern oder sogar aufheben. Durch den Austausch einer sauren Aminosäure (Glutamat) gegen eine aliphatische Aminosäure (Glycin) könnte es durch die veränderte Ladung zu einer **veränderten Proteinfaltung** und damit zu einer makroskopisch abgewandelten Form des Hormons kommen. Dadurch wäre möglicherweise auch die Affinität des Gesamthormons zum jeweiligen Rezeptor erhöht bzw. vermindert. Die Tatsache, daß Punktmutationen durch minimale Proteinstrukturveränderungen zu geänderten Affinitäten führen können, ist spätestens seit der Aufklärung der Sichelzellenanämie als erwiesen anzusehen.

Bei der **Sichelzellenanämie** bewirkt eine **Punktmutation** im Globingen einen Aminosäureaustausch, der wiederum die Tertiärstruktur des Hämoglobins verändert und letztlich zu einer morphologischen, mikroskopisch sichtbaren Formänderung der Erythrozyten und zu einer Verminderung der O₂-Bindungskapazität des Hämoglobins führt [Herold et al., 1996]. Diese bei der Patientin 3 vorgefundene Konstellation, in der auf beiden Allelen zwei verschiedene Varianten auftreten, die jeweils von einem Elternteil vererbt wurden, nennt man 'compound heterozygotie'.

Compound Heterozygotie:

Die Arbeit von Jackson et al. beschrieb eine 'Compound Heterozygotie' im **Pro-Hormon-Convertase-1-Gen** (PC1) im Zusammenhang mit Adipositas. Die erwachsene Probandin zeigte eine extreme Adipositas in ihrer Kindheit (36 kg mit 3 Jahren), eine abnormale Glukose-Homeostase, Hypocortisolismus und erhöhte Proinsulin- sowie POMC-Plasma-Konzentrationen. Mittels PCR, SSCA und Sequenzierung wurde eine heterozygote Punktmutation Glycin→Arginin in Exon 13 des PC1-Gens detektiert, die für diesen Phänotyp verantwortlich schien. Da drei der vier Kinder der Patientin eine unauffällige Gewichtsentwicklung aufwiesen, obwohl sie die Punktmutation geerbt hatten, wurde bei der Patientin eine weitere unentdeckte Mutation auf dem anderen PC1-Allel vermutet.

Eine Sequenzierung des gesamten PC1-Gens (14 Exons und jeweilige Introns) ergab einen heterozygoten Adenin→Cytosin Basenaustausch im **Intron 5** des PC1-Gens, der zu einem veränderten Splicing und zur fehlenden Translation des Exons 5 führte. Diese Mutation trat nur bei dem vierten ebenfalls normalgewichtigen und vom Hormonstatus her unauffälligen Kind der Patientin auf. Es führten also weder das heterozygote Vorkommen der einen noch der anderen Mutation alleine, sondern nur die 'Compound heterozygotie' beider Mutationen zu ausgeprägten Störungen im

Hormonhaushalt und konsekutiver Adipositas [Jackson et al., 1997].

Auf diese Arbeit bezogen könnte dies bedeuten, daß der Kettenabruch und das Fehlen der Hormone auf dem mütterlichen Allel in Kombination mit der Punktmutation und der damit veränderten Wirksamkeit der Hormone auf dem väterlichen Allel zum **Phänotyp Adipositas** bei Patientin 3 führen, während gleichzeitig beide Elternteile, als Träger nur eines mutierten Allels phänotypisch unauffällig bleiben. Um dies im Fall des POMC-Gens zu beweisen, müßte man die **Affinität und Wirksamkeit** der im mutierten Bereich produzierten Hormone an ihren jeweiligen Wirkorten messen. Da allerdings die verschiedenen Wirkmechanismen und Wirkorte von β -MSH, β -LPH oder γ -LPH in bezug auf die Gewichtsregulation noch nicht eindeutig geklärt sind, bedarf es hier weiterer Forschung, um diese Theorie zu bestätigen.

Der mögliche Einfluß dieser beiden Mutationen auf die Gewichtsregulation bei der Patientin 3 erklärt natürlich nicht das grundsätzliche Auftreten von Adipositas in der Gesellschaft, da die Kombination dieser beiden Mutationen in unserer Stichprobe von 96 Personen nur einmal aufgetreten ist und auch in anderen Publikationen noch nicht beschrieben wurde.

Es sprechen allerdings verschiedene **andere Forschungsergebnisse** dafür, daß das POMC-Gen bzw. die von ihm abgeleiteten Melanocortine an der Gewichtsregulation und an der Ausprägung verschiedener monogener Formen der Adipositas beteiligt sind.

Eine Verbindung zwischen POMC und Leptin-Stoffwechsel wurde von Cheung et al. 1997 mit Hilfe von „double label in situ hybridisation“ und „computerized image analysis“ hergestellt, in dem Cheung et al. zeigten, daß ein Teil der POMC-Neuronen im ‚Nucleus arcuatus‘ der Ratte Leptin-Rezeptor-mRNA exprimiert. Von allen POMC-Produkten wird vor allem bei den Melanocortinen eine Rolle in der Gewichtsregulation vermutet. Insbesondere **α -MSH**, dessen Zielrezeptor der Melanocortin-4-Rezeptor ist, scheint hier eine besondere Rolle zuzukommen.

Der MC-4-Rezeptor in Zusammenhang mit POMC:

Die Untersuchung des **Melano-Cortin-4-Rezeptors** bei Mäusen und Menschen zeigte, daß bei einem durch genetische Methoden eliminierten oder durch Antagonisten blockierten MC-4-Rezeptor unter anderem eine extreme **Adipositas** als Folge zu beobachten ist [Huszar et al., 1997; Lu et al., 1994; Fan et al., 1997]. Huszar's mittels Gen-Targeting gezüchteten **MC-4-Knockout-Mäuse** zeigten eine Hyperphagie (46%

größere Nahrungsaufnahme als Wildtyp-Mäuse) und eine starke Gewichtszunahme von bis zum Doppelten des Gewichts von Kontrollmäusen. Außerdem deuteten alle Serum-Parameter (Serum-Glukose, Serum-Insulin) der Knock-out-Mäuse auf eine **anabole Stoffwechsellaage** hin, ohne das diese Effekte direkt durch Leptin-Mangel ausgelöst worden sind, da die Leptin-Spiegel sich bei allen Mäusen (Mutationen und Kontrollen) proportional zur Gewichtszunahme entwickelten.

Auch beim Menschen fanden verschiedene Arbeitsgruppen Mutationen im MC4-Rezeptor-Gen, die für eine dominante Form der Adipositas verantwortlich sein können [Gotada et al., 1997; Yeo et al., 1998; Vaisse et al., 1998; Hinney et al., 1999]. Die **vier unabhängigen Arbeitsgruppen** screenen insgesamt **452** extrem adipöse Patienten und fanden bei fünf von ihnen drei verschiedene Mutationen (Insertion, Deletion und nonsense-Mutation), die jeweils zur Expression eines verkürzten und defekten MC4-Rezeptors auf einem Allel des jeweiligen Patienten führten [Gotada et al., 1997; Yeo et al., 1998; Vaisse et al., 1998; Hinney et al., 1999]. Das bedeutet, daß ungefähr ein Prozent aller extrem adipösen Individuen eine **‚haplo-Insuffizienz‘** des MC4-Rezeptors aufweist, die für das Auftreten des Übergewichts verantwortlich sein könnte [Hinney et al., 1999].

Eine Familienuntersuchung durch Sina et al. bei vier Mutationsträgern bewies die **Kosegregation** dieser Mutationen des MC4-Rezeptors mit dem Phänotyp Adipositas. Die Genotypisierung von **43** direkt verwandten Personen zeigte, daß **19** von ihnen die MC4-R-Mutation ebenfalls haploid aufwiesen und fast alle von ihnen außerdem phänotypisch als extrem adipös einzustufen waren [Sina et al., 1999]. Da **α-MSH** als das Hormon mit der höchsten Affinität für den MC-4-Rezeptor vermutet und dieses vom POMC-Gen kodiert wird, besteht hier eine Verbindung zwischen beiden Systemen.

Fazit und Perspektiven:

Die **Ergebnisse** dieser Arbeit sprechen im Gegensatz zu den beiden phänotypisch wirksamen Mutationen von Krude et al. und der Tatsache, daß bei früheren POMC-Gen-Screens bezogen auf **Schizophrenie, bipolare affektive Störungen** [Feder et al., 1985], **Torsionsdystonien** [Kramer et al., 1985; Breakefield et al., 1986] und angeborenem ACTH-Mangel [Kyllo et al., 1996] niemals Mutationen aufgetreten waren, dafür, daß Varianten im POMC-Gen, obwohl sie gehäuft auftreten, nicht spezifisch im gewichtsregulatorischen Kontext stehen. Sowohl die einzelnen von uns gefundenden Varianten als auch die von Krude et al. beschriebenen Mutationen im

Bereich des POMC-Gens, der für das α -MSH kodiert, stehen somit für vereinzelte Ausnahmefälle, die sich in größeren Stichproben nicht auffinden lassen und daher keine häufige Ursache für die in der Bevölkerung zunehmend verbreitete Adipositas darstellen.

Der **9 Bp Polymorphismus** tritt mit **5,2 %** bei unseren adipösen Probanden zwar gehäuft auf, da aber in der untergewichtigen **Kontrollgruppe** ebenfalls **4,2%** diesen Polymorphismus aufweisen, ist **keine signifikante Assoziation** zwischen dem Phänotyp Adipositas und der Ausprägung des 9 Bp Polymorphismuses vorhanden und auch keine spezifischer alleiniger Einfluß dieses POMC-Bereichs auf die Gewichtsregulation zu erwarten.

Vorhandene Mutationen im POMC (der Vorlage des α -MSH), eine fehlerhafte Prozessierung des α -MSH oder eine veränderte Zielstruktur (MC-4-Rezeptor) scheinen beim Menschen allerdings in einigen Fällen direkt zu extrem ausgeprägter Adipositas zu führen. Varianten in anderen Genbereichen des POMC-Gens zeigen keine signifikante direkte Verbindung zur Entstehung von Adipositas. Falls diese Genbereiche trotz allem in die Gewichtsregulation involviert sind, ist ihr Einfluß auf polygener Ebene zu sehen, also im Zusammenspiel mit anderen Genen und deren Hormonprodukten.

Unter der Annahme eines **polygenen Models** bei der Gewichtsregulation zeigen andere polygene Störungen, daß mehrere Gene und verschiedene Genorte beteiligt sein können. Vom theoretischen Ansatz her reicht schon eine limitierte Anzahl von Genorten mit **additiven Effekten** aus, um die Variation des Körpergewichts erklären zu können. Zwei genetische Varianten in Kombination sorgen für neun mögliche individuelle Phänotypen, und die Kombination von acht verschiedenen Genvarianten macht **3⁸** oder **6561** unterschiedliche **Phänotypen** möglich. Daraus folgt, daß unbedeutend erscheinende Allel-Varianten an schon bekannten Genorten der Gewichtsregulation für eine beträchtliche quantitative Varianz der Phänotypen verantwortlich sein können [Echwald et al., 1999b].

Man kann nach dem jetzigen Erkenntnisstand in der Gewichtsforschung also nicht davon ausgehen, daß man viele unterschiedliche Mutationen in einem bestimmten Gen findet, die wie bei einer monogenen Erkrankung für die quantitative Ausprägung einer Adipositas ursächlich sind [Wang et al., 1996].

Vielmehr sollte bei einem „**Quantitative Trait Gene**“, also einem Gen aus der Gruppe der Kandidatengene, der gesamte Promotor-, Intron- und Exon-Bereich des Gens auf Mutationen gescreent und alle abweichenden Varianten sequenziert werden.

Kopplungsanalysen lassen vermuten, daß auf den Chromosomen 10p, 5cen-q und 2p Kandidaten-Gene liegen, die mit der Entstehung von Adipositas bzw. erhöhten Plasma-Leptin-Werten kausal in Verbindung stehen.

Mit dem in dieser Arbeit untersuchten Proopiomelanocortin-Gen ist der Exon-Bereich eines der auf Chromosom 2p vorhandenen Kandidaten-Gene in einer repräsentativen Kohorte von 96 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen systematisch auf Mutationen gescreent und damit ein weiterer Schritt zur **Aufklärung** der an der Entwicklung von Adipositas beteiligten Genabschnitte getan worden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. *Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G, Begaud B*: Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* (1996); 335: 609-16
2. *Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS*: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* (1996); 382:250-252
3. *Albers HE, Ottenweller JE, Liou SY, Lumpkin MD, Anderson ER*: Neuropeptide Y in the hypothalamus: effect on corticosterone and single-unit activity. *Am J Physiol* (1990); 258: R376-82
4. *Anand BK, Brobeck JR*: Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* (1951); 24: 123-40
5. *Anders H, Rosenbauer J, Matiaske B*: Repräsentative Verzehrstudie in der Bundesrepublik Deutschland inkl. West-Berlin. Schriftenreihe der AGEV, Bd. 8. Umschau Verlag, Frankfurt (1990)
6. *Baxter JD, Rousseau GG*: Glucocorticoid hormone action: an overview. *Monogr Endocrinol* (1979); 12: 1-24
7. *Baxter JD*: Personal Communication. San Francisco. Californien, 5/1981
8. *Bertagna X, Girard F, Seurin D, et al.*: Evidence for a peptide similar to 16 K fragment in man. Its relationship to ACTH. *J Clin Endocrinol Metab.* (1980); 51: 182-184
9. *Billington CJ, Briggs JE, Link JG, Levine AS*: Glucagon in physiological concentrations stimulates brown fat thermogenesis in vivo. *Am J Physiol* (1991); 261: R501-7
10. *Böddiker I, Ziegler A*: Assoziations- und Kopplungsstudien zur Analyse von Kandidatengenen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (2000); 125: 810-815
11. *Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP*: Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* (1994); 134(6): 2367-70
12. *Bouchard C, Savard R, Després JP, Tremblay A, Leblanc C*: Body composition in adopted and biological siblings. *Hum Biol* (1985); 57: 61-75
13. *Bouchard C, Després JP, Tremblay A, Leblanc C, Thériault G*: Inheritance of the amount and distribution of human body fat. *Int J Obes* (1988); 12: 205-215
14. *Bouchard C*: Genetic factors in obesity. *Med Clin N Amer* (1989); 73: 67-81
15. *Bouchard C*: Current understanding of the etiology of obesity: genetic and non genetic factors. *Am J Clin Nutr* (1991); 53: 1561S-1565S
16. *Bouchard C, Pérusse L*: Genetics of obesity. *Ann Rev Nutr* (1993); 3: 337-354
17. *Bray GA* : Classification an evaluation of the obesities. *Med Clin N Am* (1989); 73: 161-184
18. *Bray GA*: Peptides affect the intake of specific nutrients and the sympathetic nervous system. *Am J Clin Nutr* (1992); 55: 265S-71S
19. *Bray GA*: Coherent, preventive and management strategies for obesity. *Ciba Found Symp* (1996); 201: 228-46; discussion 246-54
20. *Bray GA*: Obesity: a time bomb to be defused. *Lancet* (1998); 352: 160-1
21. *Bray GA, Blackburn GL, Ferguson JM, Greenway FL, Jain AK, Mendel CM, Mendels J, Ryan DH, Schwartz SL, Scheinbaum ML, Seaton TB*: Sibutramine produces dose-related weight loss. *Obes Res* (1999); 7(2): 189-98

22. *Breakefield XO, Bressman SB, Kramer PL, Ozelius L, Moskowitz C, Tanzi R, Brin MF, Hobbs W, Kaufman D, Tobin A, et al*: Linkage analysis in a family with dominantly inherited torsion dystonia: exclusion of the pro-opiomelanocortin and glutamic acid decarboxylase genes and other chromosomal regions using DNA polymorphisms. *J Neurogenet* (1986); 3(3): 159-75
23. *Brobeck JR, Tepperman J, Long CNH*: Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat. *Yale J Biol Med* (1943); 15: 831-53
24. *Brownell KD, Fairburn CG, eds.*: Eating disorders and obesity: a comprehensive handbook. New York: Guilford Press (1995)
25. *Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC*: Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* (1991); 48: 137-144
26. *Bultmann SJ, Michaud EJ, Woychik RP*: Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* (1992); 71: 1195-1204
27. *Burniat WM*: The genetic of childhood obesity. In: Giorgi PL, Suskind RM, Catassi C (eds.): *The obese child. Pediatr Adolesc Med* 2. Karger, Basel (1992): 21-31
28. *Butler MG*: Prader Willi syndrome: Current understandings of cause and diagnosis. *Amer J Med Genet* (1990); 35: 319-332
29. *Campfield LA, Smith FK, Guisez Y, Devos R, Burn P*: Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral Signal linking adiposity and central neural networks. *Science* (1995); 269: 546-549
30. *Carney E, Goodman HC, McBride M, Lyon B, Pratt R*: Childhood antecedents of adult obesity. Do chubby infants become obese adults? *N Engl J Med* (1976); 295: 6-9
31. *Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV*: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance *Lancet* (1996); 348: 159-161
32. *Chagnon YC, Chen WJ, Perusse L, Chagnon M, Nadeau A, Wilkison WO, Bouchard C*: Linkage and association studies between the melanocortin receptors 4 and 5 genes and obesity-related phenotypes in the Quebec Family Study. *Mol Med* (1997); 3(10): 663-73
33. *Chang AC, Cochet M, Cohen SN*: Structural organization of human genomic DNA encoding the proopiomelanocortin peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1980); 77(8): 4890-4
34. *Chehab FF, Lim ME, Lu R*: Correction of the sterility defect in homozygous *obese* female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* (1996); 12: 318-320
35. *Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf FA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP*: Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* (1996); 84: 491-495
36. *Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA*: Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* (1997); 138(10): 4489-92
37. *Chretien M, Benjannet S, Gossard F, Gianoulakis C, Crine P, Lis M, Seidah NG*: From beta-lipotropin to beta-endorphin an 'pro-opio-melanocortin'. *Canad. J. Biochem.* (1979); 57: 1111-1121.
38. *Chua SC Jr, White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada N, Leibel RL*: Phenotype of fatty due to Gin269 pro mutation in the leptin receptor (*Lepr*). *Diabetes* (1996); 45: 1141-1143
39. *Chung WK, Powerkehoe L; Chua M et al.*: Mapping of the OB receptor to 1p in a

- region of nonconserved gene order from mouse and rat to human. *Genom Research* (1996); 6: 431-438
40. *Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B*: A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* (1998); 392 (6674): 398-401
 41. *Cohen SL, Hlalaas JL, Friedman JM, Chait BT, Bennett L, Chang D, Hecht R, Collins F*: Human leptin characterization (letter). *Nature* (1996a); 382: 589
 42. *Coleman DL*: Obese and Diabetes: Two mutant genes causing diabetes obesity syndromes in mice. *Diabetologia* (1978); 14: 141-148
 43. *Coleman DL, Eicher EM*: Fat (fat) and Tubby (tub), Two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the mouse. *J Hered* (1990); 81: 424-427
 44. *Comuzzie A G et al.* A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nature Genetics* (1997), 15: 273-276
 45. *Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, Chen W, Orth DN, Pouton C, Kesterson RA*: The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog Horm Res* (1996); 51: 287-317; discussion 318
 46. *Considine R V, Considine E L, Williams C J, Nyce M R, Magosin S A, Bauer T L, Rosato E L, Colberg J, Caro J F*: Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity *J Clin Invest* (1995); 95: 2986-2988
 47. *Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL*: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* (1996b); 334: 324-325
 48. *Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF*: The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes* (1996a); 45: 992-994
 49. *Dallmann MF*: *Trends Endocrinol Metab* (1993); 4: 62
 50. *Delplanque J, Barat-Houari M, Dina C, Gallina P, Clement K, Guy-Grand B, Vasseur F, Boutin P, Froguel P*: Linkage and association studies between the proopiomelanocortin (POMC) gene and obesity in caucasian families. *Diabetologia* (2000); 43(12):1554-7
 51. *Dep Of Health*: The Nutrition and Physical Activity Task Forces: Obesity-reversing the increasing problem of obesity in England. The Health of the Nation. Dep Of Health (1995).
 52. *Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.*: Ernährungsbericht. Herausgegeben von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. im Auftr. des Bundesministers für Gesundheit und des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Frankfurt a. M. (1992)
 53. *De Vos P, Saladin R, Auwerx J, et al.*: Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* (1995); 270: 15958-15961
 54. *Dickie MM*: A new viable yellow mutation in the house mouse. *J Hered* (1962); 53: 4-86
 55. *Duhl DML, Vrieling H, Miller KA*: Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nature Genetics* (1994); 8: 58-65
 56. *Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Tybjaerg-Hansen A, Clausen JO, Pedersen O*: Mutational analysis of the proopiomelanocortin gene in Caucasians with early

- onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* (1999a); 23(3): 293-8
57. *Echwald SM*: Genetics of human obesity: lessons from mouse models and candidate genes. *J Intern Med* (1999b); 245(6): 653-66
 58. *Eipper BA, Mains RE*: Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin-endorphin and related peptides. *Endocr. Rev.* (1980); 1: 1-27
 59. *Evans DJ, Hoffmann RG, Kalkhoff RK, Kissebah AH*: Relationship of androgenic activity to body fat topography, fat cell morphology, and metabolic aberrations in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* (1983); 57(2): 304-10
 60. *Fabsitz RR, Garrison RJ, Feinleib M, Hjortland M*: A twin analysis of dietary intake: Evidence for a need to control for possible environmental difference in MZ and DZ twins. *Beh Genet* (1978); 8: 15-25
 61. *Fan W, Boston B, Kesterson R, Hruby V, Cone R*: Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* (1997); 385: 165
 62. *Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S*: Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest.* (2000);106(2):185-7
 63. *Feder J, Gurling HM, Darby J, Cavalli-Sforza LL*: DNA restriction fragment analysis of the proopiomelanocortin gene in schizophrenia and bipolar disorders. *Am J Hum Genet* (1985); 37(2): 286-94
 64. *Flier JS, Marantos-Flier E*: Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* (1992); 92: 437
 65. *Friedman JM, Leibel RL, Siegel DS, Walsh J, Bahary N*: Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* (1991); 11: 1054-1062
 66. *Friedman JM*: Personal Communication. New York, N.Y., 12/2/1994
 67. *Friedman JM, Halaas JL*: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* (1998); 395: 763-770
 68. *Gabrielli O, Coppa GV, Giorgi PL*: Syndromic obesity. In: Giorgi PL, Suskind RM, Catassi (eds.): *The obese child. Pediat Adolesc Med* 2. Karger, Basel (1992): 32-43
 69. *Garrow, JS*: Treat obesity seriously. A clinical manual. Churchill Livingstone, London (1981)
 70. *Geary N, Smith GP*: Selective hepatic vagotomy blocks pancreatic glucagon's satiety effect. *Physiol Behav* (1983); 31: 391-4
 71. *Geffroy S, De Vos P, Staels B, Duban B, Auwerx J, de Martinville B*: Localization of the human OB gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* (1995); 28: 603-604
 72. *Geraciotti TD Jr, Liddle RA*: Impaired cholecystokinin secretion in bulimia nervosa. *N Engl J Med* (1988); 319: 683-8
 73. *Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda R*: Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996); 93: 6231-6235
 74. *Gibbs J, Smith GP*: Satiety: the roles of peptides from the stomach and the intestine. *Fed Proc* (1986); 45: 1391-5
 75. *Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD*: Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* (1996);271: 3971-3974
 76. *Gotoda T, Scott J, Aitman TJ*: Molecular screening of the human melanocortin-4 receptor gene: identification of a missense variant showing no association with obesity, plasma glucose, or insulin. *Diabetologia* (1997); 40: 976-979
 77. *Gray, D S*: Diagnosis and prevalence of obesity. *Med. Clin. N.Am.* (1989); 73: 1-13
 78. *Guo SS, Roche AF, Cameron Chumlea W, Gardner JD, Siervogel RM*: The predictive value of childhood body mass index values for overweight at age 35y.

- Am J Clin Nutr (1994); 59: 810-819
79. *Hager J, Francke S, Clement K, Dina C, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel P*: A polymorphism in the 5-prime UTR region of the human OB gene is associated with morbid obesity and low leptin levels (Abstract). *Medizinische Genetik* (1997); 9: 10
 80. *Hager J, Dina C, Francke S, Dubois S, Houari M, Vatin V, Vaillant E, Lorentz N, Basdevant A, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P*: A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* (1998); 20(3): 304-8
 81. *Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM*: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* (1995); 269: 543-546
 82. *Hammer LD, Kraemer HC, Wilson DM, Ritter PL, Dornbusch SM*: Standardized percentile curves of body-mass index for children and adolescents. *AJDC* (1991); 145: 259-263
 83. *Hebebrand J, Heseker H, Himmelmann W, Schäfer H, Remschmidt H*: Altersperzentile für den Body-Mass-Index aus Daten der Nationalen Verzehrstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflußfaktoren. *Akt Ernähr-Med* (1994); 19: 259-265
 84. *Hebebrand J, Remschmidt H*: Genetische Aspekte der Adipositas. *Adipositas* (1995); 9: 20-24
 85. *Helling RB, Goodman HM, Boyer HW*: Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* (1974); 14(5): 1235-44
 86. *Herold G*: Innere Medizin-Eine vorlesungsorientierte Darstellung. (1996): 34-35
 87. *Hinney A, Rosenkranz K, Roth H, Hebebrand J*: Gene in denen Mutationen Mäuse und möglicherweise Menschen dick machen. *Adipositas* (1997); 13: 6-12
 88. *Hinney A, Becker I, Heibult O, Nottebom K, Schmidt A, Ziegler A, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J*: Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes. *J Clin Endocrinol Metab* (1998); 83(10): 3737-41
 89. *Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Görg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J*: Several mutations in the melanocortin 4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* (1999); 84: 1483-86
 90. *Hirschberg AL*: Hormonal regulation of appetite and food intake. *Ann Med* (1998); 30(1): 7-20
 91. *Hixson JE, Almasy L, Cole S, Birnbaum S, Mitchell BD, Mahaney MC, Stern MP, MacCluer JW, Blangero J, Comuzzie AG*: Normal variation in leptin levels in associated with polymorphisms in the proopiomelanocortin gene, POMC. *J Clin Endocrinol Metab* (1999); 84(9): 3187-91
 92. *Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F*: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* (1997); 88: 131-141
 93. *Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, et al.*: Obesity and impaired prohormone convertase processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* (1997); 16: 303-306
 94. *JAMA*: Long-term pharmacotherapy in the management of obesity: National Task

- Force on the Prevention and Treatment of Obesity. *JAMA* (1996); 276: 1907-15
95. Kiss JZ, Cassell MD, Palkovits M: Analysis of the ACTH/beta-End/alpha-MSH-immunoreactive afferent input to the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *Brain Res* (1984); 324: 91
 96. Kleyen PW, Fan W, Kovatas SG, Lee JJ, Pulido JC, Wu Y; Berkemeir LR, Misumi DJ, Holmgren L, Charlat O, Woolf EA, Tayber O, Brody T, Shu P, Hawkins F, Kennedy B, Baldini L, Ebeling C, Alperin GD, Deeds J, Lakey ND, Culpepper J, Chen H, Glucksmann-Kuis MA, Carlson GA, Duyk GM, Moore KJ: Identification and characterization of the mouse obesity gene *tubby*: A member of a novel gene family. *Cell* (1996); 85: 281-290
 97. Kohlmeier L, Kroke A, Pötsch J, Kohlmeier M, Marten K: Ernährungsabhängige Krankheiten und ihre Kosten. Band 27 der Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit. Baden-Baden: Nomos Verlagsgesellschaft (1993).
 98. Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, Smith U: Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* (1983); 72(3): 1150-62
 99. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A: Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genet* (1998); 19: 155-157
 100. Kylo JH, Collins MM, Vetter KL, Cuttler L, Rosenfield RL, Donohoue PA: Linkage of congenital isolated adrenocorticotrophic hormone deficiency to the corticotropin releasing hormone locus using simple sequence repeat polymorphisms. *Am J Med Genet* (1996); 62(3): 262-7
 101. Laatikainen TJ, Apter DL, Paavonen JA, Wahlström TR: Steroids in ovarian and peripheral venous blood in polycystic ovarian disease. *Clin Endocrinol* (1980); 13: 125-34
 102. Lee G-H, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JJ, Friedman JM: Abnormal splicing of the leptin receptor in *diabetic* mice. *Nature* (1996); 379: 632-635
 103. Leibowitz SF: Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behavior. *Fed Proc* (1986); 45(5): 1396-403
 104. Leonhardt M, Hrupka B, Langhans W: New approaches in the pharmacological treatment of obesity. *Eur J Nutr* (1999); 38(1): 1-13
 105. Levinson G, Gutman GA: Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* (1987); 4(3): 203-21
 106. Lewis DE, Shellard L, Koeslag DG, Boer DE, McCarthy HD, McKibbin PE, Russell JC, Williams G: Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats. *Am J Physiol* (1993); 264: E279
 107. Linden Hirschberg A, Lindholm C, Carlström K, von Schoultz B: Reduced serum cholecystokinin response to food intake in female athletes. *Metabolism* (1994); 43: 217-22
 108. Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M: Overexpression of the obese (*ob*) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nature Med* (1995); 1: 950-953
 109. Lu D, Willard D, Patel IR: Agouti protein is an antagonist of the melanocyte stimulating-hormone receptor. *Nature* (1994); 371: 799-802
 110. MacDougald OA, Hwang CS, Fan HY: Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl. Acad Sci USA* (1995); 92: 9034-9937
 111. Madej T, Boguski MS, Bryant SH: Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett* (1995); 373: 13-18
 112. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S,

- Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM*: Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* (1995b); 1: 1155-1161
113. *Markoff A, Savov A, Vladimirov V, Bogdanova N, Kremensky I, Ganey V*: Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clin Chem* (1997); 43: 30-33
114. *Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P*: Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* (1996); 387: 113-6
115. *Micozzi MS, Albanes D, Jones DY, Chumlea WC*: Correlations of body mass indices with weight, and body composition in men und women in NHANES I and II. *Am J Clin Nutr* (1986); 44: 725-731
116. *Miller SA, Dykes DD, Polesky HF*: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* (1988); 16: 1215
117. *Mc Kusick VA*: Mendelian inheritance in man. 9th ed. John Hopkins University Press, Baltimore (1990)
118. *Moll PP, Burns TL, Lauer RM*: The genetic and denviromental sources of body mass index variability: The Muscatine ponderosity family study. *Am J Hum Genet* (1991); 49: 1243-1255
119. *Moltz JH, McDonald JK*: Neuropeptide Y: direct and indirect action on insulin secretion in the rat. *Peptides* (1985); 6: 1155-9
120. *Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S*: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* (1997); 387: 903-908
121. *Moran TH, Ameglio PJ, Schwartz GJ, McHugh PR*: Blockade of tyoe A, but not type B, CCK receptors attenuates satiety actions of exogenous and endogenous CCK. *Am J Physiol* (1992); 262: R46-50
122. *Morris JC, Bertram CE, Lowry PJ, Savva D*: Cryptic trinucleotide repeat polymorphism in the POMC gene. *Hum Mol Genet* (1994); 3(11): 2080
123. *Mountjoy K, Mortrud M, Low M, Simerly R, Cone R*: Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* (1994); 8: 1298
124. *Müller MJ*: Therapie der Adipositas erfordert Umstellung der Lebensgewohnheiten. *Pharmazeutische Zeitung* (1997); 142: 11-2
125. *Mullis KB, Faloona FA*: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* (1987); 155: 335-50
126. *Murakami T, Iida M, Shima K*: Dexamethasone regulates obes expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Com* (1995); 214: 1260-1267
127. *Must A, Dallal GE, Dietz WH*: Reference data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht²) and triceps skinfold thickness 1-4. *Am J Clin Nutr* (1991); 53: 839
128. *Must A, Jacques PF, Dallal GE, Bajema CJ, Dietz WH*: Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. *N Engl J Med* (1992); 327: 1350-1355
129. *Mutt V*: Secretin and Cholecystokinin. In: Mutt V. ed. *Advances in Metabolic disorders. II. Gastrointestinal Hormones*. San Diego, CA: Academic Press (1988); 11: 270-320
130. *Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH*: Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet*

- (1995); 10: 135-142
131. *Nieto FJ, Szklo M, Comstock GW*: Childhood weight and growth rate as predictors of adult mortality. *Am J Epidemiol* (1992); 136: 201-213
 132. *Noben-Trauth K, Naggert J, North M, Nishina P*: A candidate for the mouse mutation *tubby*. *Nature* (1996); 380: 534-538
 133. *O'Donohue TL, Dorsa DM*: The opiomelanotropinergic neuronal and endocrine systems. *Peptides* (1982); 3: 353-395
 134. *O'Donohue TL et al.*: *Peptides* (1985); 6: 755
 135. *Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T*: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* (1989); 86: 2766-2770
 136. *Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F*: Effects of the *obese* gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* (1995); 269: 540-543
 137. *Phillipp E, Pirke KM, Kellner MB, Krieg JC*: Disturbed cholecystokinin secretion in patients with eating disorders. *Life Sci* (1991); 48(25): 2443-50
 138. *Pirke KM, Friess E, Kellner MB, Krieg JC, Fichter MM*: Somatostatin in eating disorders. *Int J Eat Disord* (1994); 15: 99-102
 139. *Prader A, Labhart H, Willi H*: Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myotonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz Med Wschr* (1956); 86: 1260-1261
 140. *Price RA, Cadoret RJ, Stunkard AJ, Throughton E*: Genetic contributions to human fatness: An adoption study. *Am J Psychiat* (1987); 144: 1003-1008
 141. *Pschyrembel* : *Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter Verlag; 256. Auflage: S.512
 142. *Rebuffe-Scrive M, Marin P, Bjorntorp P*: Effect of testosterone on abdominal adipose tissue in men. *Int J Obes* (1991); 15(11): 791-5
 143. *Rink TJ*: In search of a satiety factor. *Nature* (1994); 372: 408-409
 144. *Ritter S, Weatherford SC, Stone SL*: Glucagon-induced inhibition of feedings is impaired by hepatic portal alloxan injection. *Am J Physiol* (1986); 250: R682-90
 145. *Rolland-Cachera, M. F., F. Belliste, M. Deheeger, M. Guilloud-Bataille, F. Pequignot, M. Sempé*: In: *Björntorp, P., Rössner*(Eds.): *Obesity in Europe '88*. John Libbey, London, Paris (1988)
 146. *Rolland-Cachera, MF*: Body composition during adolescence: methods, limitations and determinations. *Horm Res* (1993); 39: 25-40
 147. *Rolland-Cachera M. F., T. J. Cole, M. Sempé*: Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* (1991); 45: 13-21
 148. *Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J*: Obesity. *N Engl J Med* (1997); 337(6): 396-407
 149. *Ross R, Shaw KD, Martel Y, de Guise J, Avruch L*: Adipose tissue distribution measured by magnetic resonance imaging in obese women. *Am J Clin Nutr* (1993); 57: 470-475
 150. *Rothwell N*: Central effects of CRF on metabolism and energy balance. *Neurosci Biobehav* (1990); 14: 263
 151. *Rotimi CN, Comuzzie AG, Lowe WL, Luke A, Blangero J, Cooper RS*: The quantitative trait locus on chromosome 2 for serum leptin levels is confirmed in African-Americans. *Diabetes* (1999); 48(3): 643-4
 152. *Rubinstein M, Mogil JS, Japon M, Chan EC, Allen RG, Low MJ*: Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996); 93(9):3995-4000
 153. *Rychlik W*: Selection of primers for polymerase chain reaction. In *White BA* (Hrsg): *PCR-Protocols, Current methods and applications*. Humana Press, Totowa,

- New Jersey (1993); 31-40
154. *Sachs, L*: Angewandte Statistik. (1979); 5. Auflage: 288-290
 155. *Saladin R, De Vos P, Guerre-Milo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J*: Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* (1995); 377: 527-529
 156. *Sambrook J, Gething MJ*: Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* (1989); 342(6247): 224-5
 157. *Satoh M, Mori S*: Subregional assignment of the proopiomelanocortin gene (POMC) to human chromosome band 2p23.3 by fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet. Cell Genet* (1997); 76: 221-222
 158. *Schimmel P*: Hazards and their exploitation in the applications of molecular biology to structure-function relationships. *Biochemistry* (1990); 29(41): 9495-502
 159. *Schimmel P, Musier-Forsyth K*: 'Distorted' RNA helix recognition. *Nature* (1996); 384(6608): 422
 160. *Schneider R, Eberhard W, Hesecker H, Moch KJ*: Die VERA-Stichprobe im Vergleich mit Volkszählung, Mikrozensus und anderen nationalen Untersuchungen. Band II. In: *Kübler W, Anders HJ, Heeschen W, Kohlmeier M (eds.)*: VERA-Schriftenreihe. Wissenschaftlicher Fachverlag Dr. Fleck, Niederkleen (1992)
 161. *Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DJ*: Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* (1996); 98: 1101
 162. *Schwartz MW, Brunzell JD*: Regulation of body adiposity and the problem of obesity. *Arterioscl Throm Vasc Biol* (1997a); 17: 233-238
 163. *Schwartz MW, Seeley RJ*: Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *N Engl J Med* (1997); 336: 1802
 164. *Seeley RJ, van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA, Bell SM, Baskin DG, Woods SC, Schwartz MW*: Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res* (1996); 28: 664
 165. *Seidell JC, Bjorntorp P, Sjöström L, Kvist H, Sannerstedt R*: Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism* (1990); 39(9): 897-901
 166. *Seidell JC*: Obesity in Europe. *Intern J Obesity* (1995); 19: S1-S4 (Suppl 3).
 167. *Seldin MF, Mott D, Bhat D*: Glykogensynthase: a putative locus for diet-induced hyperglycaemia. *J Clin Invest* (1994); 94: 269-276
 168. *Sharp PA, Sugden B, Sambrook J*: Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* (1973); 12(16): 3055-63
 169. *Scheen AJ, Lefebvre PJ*: Pharmacological treatment of obesity: present status. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999 Feb;23 Suppl 1:47-53
 170. *Sina M, Hinney A, Ziegler A, Neupert T, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J*: Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *Am J Hum Genet* (1999); 65(6): 1501-7
 171. *Sinha MK, Ohannesian JP, Heimann ML*: Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* (1996); 97:1344-1347
 172. *Siracusa LD*: The agouti gene: turned on to yellow. *TIG* (1994); 10: 423-428
 173. *Sjöström L*: Impact of body weight, body composition, and adipose tissue distribution on morbidity and mortality. In: *Obesity, Theory and Therapie*; Stunkard AJ, Wadden TA; eds. 2nd ed.:13-41. Raven Press New York (1993)

174. *Sjostrom L*: New aspects of weight-for-height indices and adipose tissue distribution in relation to cardiovascular risk and total adipose tissue volume. *Recent Advances in Obesity Research V*, 66-76. John Libbey, London (1986)
175. *Sjostrom L, Rissanen A, Andersen T, Boldrin M, Golay A, Koppeschaar HP, Krempf M*: Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. European Multicentre Orlistat Study Group. *Lancet* (1998); 352 (9123): 167-72
176. *Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R, Simansky KJ*: Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in rat. *Science* (1981); 213: 1036-7
177. *Smith MS*: Lactation alters neuropeptide-Y and proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat. *Endocrinology* (1993); 133: 1258
178. *Sørensen TIA, Price RA, Stunkard AJ, Schulsinger F*: Genetics of obesity in adult adoptees and their biological siblings. *Brit Med J* (1989); 298: 87-90
179. *Sørensen TIA, Holst C, Stunkard AJ, Skovgaard LT*: Correlations of body mass index of adult adoptees and their biological and adoptive relatives. *Int J Obes* (1992); 16: 227-236
180. *Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, Basso AM, Rivier J, Vale W, Koob GF*: Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* (1996); 273: 1561
181. *Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF*: Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* (1986); 7(6): 1189-92
182. *Stephens TW, Basinski M, Bristow PK*: The role of neuropeptide Y in the antiobese action of the obese gene product. *Nature* (1995); 377: 530-532
183. *Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg A D*: A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity (Letter) *Nature Genet* (1998); 18: 213-215
184. *Stunkard AJ, Sørensen TIA, Hanis C, Teasdale TW, Chakraborty R, Schull W J, Schulsinger F*: An adoption study of human obesity. *N Engl Med* (1986); 314: 193-198
185. *Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE*: The body mass-index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med* (1990); 332: 1483-1487
186. *Sypckerelle Y, Guenguen R, Guillemot M, Tosi E, Dechamps JP*: Adiposity indices and clinical opinion. *Ann Hum Biol* (1988); 15: 45-55
187. *Takahashi H, Hakamata Y, Watanabe Y, Kikuno R, Miyata T, Numa S*: Complete nucleotide sequence of human corticotropin-beta-lipotropin precursor gene. *Nucleic Acids Res* (1983); 11: 6847-6858
188. *Tartaglia LA, Dembski M, Werng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI*: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* (1995); 83: 1263-1271
189. *Taylor BA, Phillips SJ*: Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* (1996); 34: 389-398
190. *Teasdale TW, Sørensen TIA, Stunkard AJ*: Genetic and early environmental components in sociodemographic influences on adult body fatness. *Brit Med J* (1990); 300: 1615-1618
191. *Trayhurn P, Thoma MEA, Duncan JS, et al.*: Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Letters* (1995a); 368: 488-490
192. *Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV*: Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: Mediation by the sympathetic

- system. *Biochem J* (1995b); 311: 729-733
193. *Uusitupa M*: New aspects in the management of obesity: operation and the impact of lipase inhibitors. *Curr Opin Lipidol* (1999); 10(1): 3-7
 194. *Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P*: A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* (1998); 20: 113-4
 195. *Vanderweele DA, Xavier Pi-Sunyer F, Novin D, Bush MJ*: Chronic insulin infusion suppresses food ingestion and body weight gain in rats. *Brain Res Bull* (1980); 5: 5-11
 196. *Wade GN, Gray JM*: Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav* (1979); 22(3): 583-93
 197. *Walsh KM, Leen E, Lean ME*: The effect of sibutramine on resting energy expenditure and adrenaline-induced thermogenesis in obese females. *Int J Obes Relat Metab Disord* (1999); 23(10): 1009-15
 198. *Wang W, Okayama H, Shirato K*: Genotypes of cystic fibrosis (CF) reported in the world and polymorphisms of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Nippon Rinsho* (1996); 54(2): 525-32
 199. *Warden CH, Fisler JS, Shoemaker SM, et al.*: Identification of four chromosomal loci determining obesity in a multifactorial mouse model. *J Clin Invest* (1995); 95: 1545-1552
 200. *Watson, PE, ID Watson, RD Batt*: Obesity indices. *Am J Clin Nutr* (1979); 32: 736-737
 201. *Weigle DS, Ganter SL, Kuijper JL, Leonetti DL, Boyko EJ, Fujimoto WY*: Effect of regional fat distribution and Prader-Willi syndrome on plasma leptin levels. *J Clin Endocr Metab* (1997); 82: 566-570
 202. *West DB, Fey D, Woods SC*: Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am J Physiol* (1984); 246(5 Pt 2): R776-87
 203. *Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH*: Predicting obesity in young adulthood from childhood and parenteral obesity. *N Engl J Med* (1997); 337: 869-873
 204. *White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Targaglia LA*: Leptin receptor(OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem* (1997); 272: 4065-4071
 205. *Woods SC, Porte D Jr, Bobbioni E, Ionescu E, Sauter JF, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B*: Insulin: its relationship to the central nervous system and to the control of food intake and body weight. *Am J Clin Nutr* (1985); 42(5 Suppl): 1063-71
 206. *World Health Organisation*: Obesity: Preventing and managing. The global epidemic report of a WHO Consultation on obesity. Geneva 3-5 June 1997. WHO (1998)
 207. *World Health Organisation*: The ICD-10 Classification of Mental and Behavioral Disorders—Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. WHO, Geneva (1992)
 208. *Xu XF, Bjorntorp P*: Effects of dexamethasone on multiplication and differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp Cell Res* (1990); 189(2): 247-52
 209. *Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U*: Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* (1999); 5(9): 1066-70
 210. *Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S*: A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* (1998); 20: 111-2
 211. *Zabel BU, Nayler SL, Sakaguchi AY, Bell GI, Shows TB*: High-resolution chromosomal localization of human genes for amylase, proopiomelanocortin, somatostatin, and a DNA fragment (D3S1) by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990); 87(12): 4685-9

- Sci (1983); 80: 6932-6936
212. Zhang FM, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churger LM, Clawson DK, Dimarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Schmith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW: Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* (1997); 387: 206-209
213. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* (1994); 372: 425-432

ANHANG

1. Lebenslauf

Klaus Nottebom

Saarlandstraße 56

44139 Dortmund

0231/5311755

Persönliche Angaben

Familienstand	Verheiratet /eine Tochter und ein Sohn
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Geburtsdatum	24.11.1971
Geburtsort	Siegen
Eltern	Dipl.-Ing. Hans Nottebom Dr. med Karin Nottebom
Geschwister	Birgit Nottebom

Schulische Ausbildung

1978 - 82	Grundschule , <i>Landgrafengrundschule Dortmund</i>
1982 - 91	Gymnasium , <i>Phoenix-Gymnasium Dortmund-Hörde</i>
1991	Abitur am <i>Phoenix-Gymnasium Dortmund-Hörde</i>

Universitäre Ausbildung

April 1993	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der <i>Philipps-Universität Marburg</i>
April 1995	Ärztliche Vorprüfung
September 1995	Praxisfamulatur in der <i>Gemeinschaftspraxis Nölling</i> (Allergologie/ HNO)
April 1996	erstes Staatsexamen
August/September 1996	Auslands-Famulatur im <i>Mercy-Hospital-Cork/Irland</i> (Innere Medizin)
Oktober 1996-März 1997	Auslands-Semester an der <i>Leopold-Franzens-Universität Innsbruck /Österreich</i>
März 1997	Famulatur im <i>Hospital zum Heiligen Geist, Hagen</i> (Anästhesie und Intensivmedizin)
August 1997	Famulatur im <i>Städtischen Krankenhaus Fulda</i> (Pädiatrie)
Januar 1998	Übernahme des Themas und Beginn mit dem molekularbiologisch-experimentellen Teil meiner Promotion am <i>Institut für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Philipps-Universität Marburg</i>
Oktober 1998	Ende des experimentellen Teils meiner Promotion
April 1999	zweites Staatsexamen
Oktober 1999-September 2000	Praktisches Jahr an den <i>Städtischen Kliniken Dortmund</i> (Lehrkrankenhaus der Uni-Münster)
Dezember 2000	drittes Staatsexamen
Seit Februar 2001	Arzt in der Weiterbildung an den <i>Städtischen Kliniken Dortmund</i> (Lehrkrankenhaus der Uni-Münster) im Fach Anästhesiologie

2. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren, denen ich zu großem Dank verpflichtet bin.

Arnold, Rudolf	Joseph, Klaus	Seyberth, Hannsjörg
Aumüller, Gerhard	Kälble, Tilmann	Slenczka, Werner
Aurich, H-G	Kalbfleisch, Heinrich	Steininger, Birte
Basler, Heinz-Dieter	Karlson, Peter	Stinner, Benno
Baum, Erika	Kern, Horst Franz	Sturm, Gerhard
Beato, Miguel	Kleine, Tilmann Otto	Thomas, Carlos
Bennet, M-A	Klenk, Hans-Dieter	Thumfart, W-F
Bien, Siegfried	Klose, Klaus Jochen	Töllner, Uwe
Bohra, Shravan	Koolman, Jan	Vohland, Horst-Wilhelm
Christiansen,	Kraus, P	Voigt, Karlheinz
Dapunt, O	Kretschmer, Volker	Wellstein, Anton
Daut, Jürgen	Krieg, Jürgen-Christian	Wesemann, Wolfgang
Eschenbach, C.	Kroll, Peter	Westermann, Reiner
Farrokhzad, S	Kummer, Wolfgang	Wichert, Peter von
Feuser, Beate	Lang, Rudolf Ernst	
Fritsch, P	Lennartz, Herbert	
Fuhrmann, Günther Fred	Maisch, Bernhard	
Ganz, Horst	Mannherz, H-G	
Geus, Armin	Mennel, Hans-Dieter	
Göke, Burkhard	Moosdorf, Rainer	
Göttinger, Wolfgang	Nölling, Hans-Peter	
Gotzen, Leo	Nölling, Perdita	
Gressner, Axel M.	Oertel, Wolfgang	
Griss, Peter	Perst, H	
Grzeschik, Karl-Heinz	Ransmayr, D	
Habermehl, Adolf	Remschmidt, Helmut	
Happle, Rudolf	Rothmund, Matthias	
Hasilik, Andrej	Schäfer, Helmut	
Havemann, Klaus	Schachtschabel, Dietrich	
Hebebrand, Johannes	Schulz, Klaus-Dieter	
Hinney, Anke	Schwarz, Ralph	
Holzberger, Peter	Seifart, Klaus-Heinrich	
Huffmann, Georg	Seitz, Jürgen	

3. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt vor allem dem Leiter der Klinischen Forschergruppe an der Philipps-Universität Marburg für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Herrn Prof. Dr. Johannes Hebebrand, für die Überlassung des Themas. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt, dem Leiter der Kinder- und Jugendpsychiatrie der Philipps-Universität Marburg.

Des weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Anke Hinney, Klinische Forschergruppe, für ihre vielen Ratschläge und Tips sowie die regelmäßigen Fortbildungsveranstaltungen. Mein Dank gilt Gerti für ihre freundliche und humorvolle Betreuung während meiner Labortätigkeit, und auch den übrigen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts möchte ich dafür, daß sie meine Arbeit unterstützten, sich immer für Fragen offen zeigten und wertvolle Hinweise und Anregungen lieferten, meinen Dank aussprechen.

Der Autor bedankt sich außerdem bei seinen Eltern Dr. med. Karin und Hans Nottebom für die Unterstützung über die gesamte Zeit des Studiums, bei seiner Frau Kathrin für Hilfe, Verständnis und Korrekturlesen, bei der gesamten klinischen Forschergruppe für die gute Zusammenarbeit und Hilfe, bei seinen Mitdoktoranden für die schöne Zeit und das kollegiale Verhalten.

Und last but not least gilt mein Dank natürlich allen Patienten, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

4. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**„Molekulargenetische Mutationsanalyse des
Proopiomelanocortin-Gens bei extrem adipösen
Kindern und Jugendlichen“**

im Zentrum für Nervenheilkunde - Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie - unter Leitung von Prof. Dr. J. Hebebrand mit Unterstützung durch Dr. A. Hinney ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde zum Teil unter folgendem Titel und in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes.

J Clin Endocrinol Metab (1998); 83(10): 3737-41

Dortmund, den 9. März 2003